ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

ANNEE 1981 N° 104

LE POISSON, VECTEUR DE BACTERIES PATHOGENES POUR LES HOMEOTHERMES: ETUDE EXPERIMENTALE.

THESE

POUR LE DOCTORAT VETERINAIRE.

(Diplôme d'Etat.)

Présentée et soutenue publiquement en 1981
devant l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

par

LE GAC Pierre, Jean, François
Né le 16 Mai 1953 à NEVERS (Nièvre)

MEMBRES DU JURY :

Président : Monsieur MONNIER
Professeur à l'Université Paul Sabatier de Toulouse.

Assesseur : Monsieur DORCHIES
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

Assesseur : Monsieur EECKHOUTTE
Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

DOCTORAT VETERINAIRE

Diplôme d'Etat

N° 104

LE POISSON, VECTEUR DE BACTERIES PATHOGENES POUR LES HOMEOTHERMES

ETUDE EXPERIMENTALE

LE GAC Pierre, Jean, François
Né le 16 Mai 1953 à NEVERS (Nièvre)

JURY : MM. MONNIER
DORCHIES
EECKHOUTTE

Ministère de l'Agriculture

ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur ..... M. LAUTIE

Directeur honoraire ..... M. FLORIO

Professeurs honoraires ..... MM. BRIZARD
BERTHELON
SAURAT

PERSONNEL ENSEIGNANT

CHAIRE DE PHARMACIE ET TOXICOLOGIE

Professeur titulaire ..... M. GODFRAIN
Professeur sans chaire ..... Mme BURGAT-SACAZ

Pharmacie et Toxicologie

CHAIRE DE PHYSIQUE ET CHIMIE BIOLOGIQUES ET MEDICALES

Professeur titulaire ..... MM. RICO
Professeur sans chaire ..... BRAUN
Maître-Assistant ..... BENARD

Physique biologique et médicale
Chimie Biologique et médicale

CHAIRE D'ANATOMIE DES ANIMAUX DOMESTIQUES

Professeur titulaire ..... MM. PAVAUX
Maître-Assistant ..... LIGNEREUX
Maître-Assistant ..... SAUTET

Anatomie descriptive - Extérieur
Anatomie appliquée - Tératologie

CHAIRE DE PHYSIOLOGIE ET THERAPEUTIQUE

Professeur titulaire ..... MM. RUCKEBUSCH
Professeur sans chaire ..... FARGEAS
Maître-Assistant Agrégé ..... TOUTAIN

Physiologie - Pharmacodynamie et
Thérapeutique

.../

CHAIRE D'HISTOLOGIE - ANATOMIE PATHOLOGIQUE

Professeur titulaire	MM. VAN HAVERBEKE
Professeur sans chaire	CABANIE
Maître Assistant Agrégé	MAGNOL

Histologie - Embryologie
Anatomie Pathologique

CHAIRE D'HYGIENE ET INDUSTRIE DES ALIMENTS D'ORIGINE ANIMALE

Professeur titulaire	MM. LABIE
Maître de Conférences	EECKHOUTTE
Maître-Assistant Agrégé	Mme BENARD

Hygiène, Inspection, Contrôle et Technologie
des Denrées alimentaires d'Origine Animale

CHAIRE DE PARASITOLOGIE ET MALADIES PARASITAIRES

Professeur titulaire	MM. DORCHIES
Maître de Conférences	FRANC
Maître-Assistant	DUCOS DE LAHI

Zoologie appliquée - Parasitologie externe
Parasitologie interne - Clinique

CHAIRE DE SEMIOLOGIE ET PATHOLOGIE MEDICALE DES EQUIDES ET CARNIVORES

Professeur titulaire	MM. LESCURE
Maître de Conférences	GUELFI
Maître Assistant	REGNIER

Sémiologie et Pathologie Médicale des
Equidés et Carnivores
Législation Vétérinaire et Déontologie
Clinique

CHAIRE DE PATHOLOGIE MEDICALE DU BETAIL ET DES ANIMAUX DE BASSE-COUR

Professeur titulaire	MM. TOURNUT
Maître de Conférences	BEZILLE
Maître-Assistant	JOUGLAR

Sémiologie et Pathologie Médicale du Bétail
et des Animaux de Basse-Cour - Clinique
Clinique ambulatoire

CHAIRE DE PATHOLOGIE CHIRURGICALE

Professeur titulaire	MM. CAZIEUX
Maître-Assistant Agrégé	GENEVOIS
Maître-Assistant	AUTEFAGE

Propédeutique et Sémiologie Chirurgicale
Technique Chirurgicale - Pathologie
Chirurgicale - Clinique

.../

CHAIRE DE PATHOLOGIE DE LA REPRODUCTION

Professeur titulaire	MM. FERNEY
Professeur sans chaire	ROYAL
Maître-Assistant Agrégé	TAINTURIER

Sémiologie et Propédeutique - Pathologie de la Reproduction - Obstétrique - Clinique

CHAIRE DE MALADIES CONTAGIEUSES - ZOONOSES - LEGISLATION SANITAIRE

Professeur titulaire	MM. CHANTAL
Maître de Conférences	GANIERE
Maître-Assistant	PICAVET

Maladies Contagieuses - Zoonoses
Législation Sanitaire

CHAIRE DE PATHOLOGIE GENERALE - MICROBIOLOGIE IMMUNOLOGIE

Professeur titulaire	MM. LAUTIE
Maître-Assistant	PELLERIN

Microbiologie - Immunologie
Pathologie Générale

CHAIRE DE ZOOTECHNIE ET ECONOMIE RURALE

Professeur titulaire	MM. QUEINNEC
Professeur sans chaire	DARRE
Maître-Assistant	Mme QUEINNEC

Ethnologie - Génétique appliquée - Hygiène Générale - Zootechnie - Elevage
Economie Générale et des Productions Animales

CHAIRE D'ALIMENTATION

Professeur titulaire	MM. FALIU
Professeur sans chaire	GRIESS

Botanique appliquée et bromatologie
Agronomie - Alimentation

CHARGES D'ENSEIGNEMENT

MM. les Professeurs ANGELIER, ARMENGAUD, AUVERGNAT, BLANC, BOURBON, COMBES, COMBRET, CROS, FERNET, LE BIHAN, MAZENC, RIVES.

La Faculté et l'Ecole déclarent n'être pas responsables des opinions émises par les candidats (délibération de la Faculté en date du 10 Mai 1891 et du Conseil de l'Ecole en date du 13 Juin 1924.

A ma mère

A mon frère et mes soeurs

A ma famille

A mes amis

Ce travail a été réalisé au Laboratoire d'Ecologie des Microorganismes (Centre de Recherches Hydrobiologiques de Saint-Pée-sur-Nivelle - I.N.R.A. - Pyrénées-Atlantiques). Nous y avons été accueillis par son Directeur, le Docteur Vétérinaire R. LESEL, qui nous a inspiré ce travail. Qu'il trouve ici, ainsi que tout le personnel du laboratoire, l'assurance de nos sincères remerciements pour l'aide et l'intérêt manifestés.

Que Monsieur et Madame LESEL trouvent ici l'expression de notre reconnaissance pour la gentillesse et l'humanité dont ils ont toujours fait preuve à notre égard.

Nous remercions Monsieur MONNIER, Professeur à l'Université Paul Sabatier de TOULOUSE qui nous fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse.

Monsieur DORCHIES, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE, nous encourageant dans la voie de l'Hydrobiologie, nous a accueilli avec bienveillance dans son laboratoire. Nous l'en remercions.

Monsieur EECKHOUTTE, Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE, a bien voulu faire partie de notre jury de thèse. Nous l'en remercions.

A la mémoire du Docteur Jean LE GAC

(1906 - 1978)

LE POISSON, VECTEUR DE BACTERIES PATHOGENES POUR

LES HOMEOTHERMES - ETUDE EXPERIMENTALE

INTRODUCTION

Première partie : Contamination expérimentale des Poissons par les Entérobactéries

1. INTRODUCTION

2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

   2.1 Principe

   2.2 Matériel

   2.3 Techniques microbiologiques

3. RESULTATS

4. DISCUSSION

   4.1 Caractéristiques du transit bactérien

   4.2 Influence du taxon

   4.3 Facteurs du transit et leur influence sur la multiplication

   4.4 Les facteurs de la réceptivité

5. CONCLUSIONS

Seconde partie : Facteurs limitants de la survie des Entérobactéries lors du transit digestif

1. INTRODUCTION

2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

   2.1 Les facteurs contrôlés

   2.2 Les réservoirs digestifs artificiels

      2.2.1 Les facteurs physico-chimiques

      2.2.2 Les facteurs microbiologiques

         2.2.2.1 Microflore saprophyte

         2.2.2.2 Microflore de contamination

   2.3 Modalités expérimentales

3. RESULTATS

3.1 Caractéristiques générales

3.2 Croissance dans les estomacs artificiels

3.3 Croissance dans les intestins artificiels

4. DISCUSSION

4.1 Influence du milieu artificiel

4.2 Influence des paramètres propres aux divers compartiments

4.2.1 Influence de la densité initiale de la microflore

4.2.2 Influence du pH et des sels biliaires

4.2.3 Influence de la température

4.2.4 Influence du temps de séjour

4.2.5 Influence de l'identité taxonomique

4.3 Influence de l'antibiorésistance

5. CONCLUSIONS

CONCLUSION GENERALE

Le Poisson, vecteur de bactéries pathogènes pour les Homéothermes. Etude expérimentale

Résumé

Le transit de trois entérobactéries, Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Serratia sp., pouvant être hébergées dans le tube digestif de Vertébrés homéothermes et y exercer un pouvoir pathogène, a été étudié expérimentalement. La vitesse du transit digestif varie selon le taxon et l'apparition des corps bactériens dans les fèces est très rapide. Les facteurs physico-chimiques rencontrés dans les compartiments digestifs sont susceptibles de limiter la microflore exogène; la condition physique des poissons ainsi que le temps de contact avec l'agent contaminant, pourraient expliquer les divergences entre les résultats obtenus par les différents auteurs. La reproduction in vitro des conditions régnant dans les compartiments digestifs confirme le rôle limitant de l'acidité gastrique sur le développement des entérobactéries, effet d'autant plus marqué que la température est plus élevée. La présence de sels biliaires, un pH neutre et une température voisine de 37° C favorisent cette microflore de contamination. L'influence de l'effet thermique est plus ou moins marquée suivant le taxon. L'utilisation du concept "Poisson vecteur de bactéries pathogènes pour les Homéothermes" doit tenir compte des nombreux paramètres susceptibles d'influer sur la survie et la multiplication des bactéries contaminantes.

Abstract

The transit of three Enterobacteria (Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Serratia sp.) which may lodge into the digestive tract of homeothermic Vertebrates and exert in it a pathogenic effect, has been experimentally studied. The digestive transit speed varies according to the taxon and the presence of bacterial bodies in the feces occurs very quickly. The physico-chemical factors encountered in the digestive compartments are likely to limit the exogenous microflora. The physical condition of fish, the duration of contact with the contaminating agent might explain the differences between the results obtained among various authors. The in vitro reproduction of the conditions found in the digestive compartments confirms that the gastric acidity plays a limited part on the enterobacteria development, and the more so as the temperature increases. The presence of biliary salts, neutral pH and a temperature around 37° C is propitious to this contaminating flora. The thermic influence is more or less marked according to the taxon. When using the concept "Fish as a vector of pathogenic bacteria for the Homeotherms", one must take into account the numerous parameters likely to have an effect upon the survival and multiplication of the contaminating bacteria.

LE POISSON, VECTEUR DE BACTERIES PATHOGENES POUR LES HOMEOTHERMES - ETUDE EXPERIMENTALE

-oOo-

Les plans d'eaux constituent le secteur d'accumulation naturel des contaminations de toutes sortes apportées par les eaux de ruissellement provenant du bassin versant. Substances dissoutes et éléments figurés aboutissent à l'étang, au lac, à la rivière ... Les flores bactériennes terrigènes peuvent ainsi être retrouvées dans le milieu aquatique. Dans ces populations se retrouvent des taxons bactériens appartenant aux groupes fonctionnels actifs dans le sol, mais aussi des bactéries hôtes du tube digestif des animaux, éliminées avec les excréments et dont la présence est indicatrice d'une pollution fécale. Les poissons vivant dans ces eaux contaminées peuvent alors être porteurs de bactéries provenant du tractus digestif des mammifères et oiseaux. Cette situation, importante dans le cadre du contrôle sanitaire des produits de la pêche, concerne en milieu continental tous les plans d'eau ouverts à la pêche sportive ou professionnelle. Divers auteurs (SHEWAN, 1961; SHEWAN et HOBBS, 1967) ont suggéré que la flore bactérienne du poisson était un reflet de celle de leur environnement. HORSLEY (1973) a analysé la microflore des branchies et de la peau de Salmo salar et montré qu'elle était analogue à celle de l'environnement du poisson. LESEL (1979) précise que les taxons présents dans le tube digestif sont les mêmes que ceux de l'eau mais qu'il n'y a pas de relation directe entre la présence des uns et celle des autres.

Le problème se pose donc de savoir dans quelle mesure un taxon exogène provenant d'un vertébré homéotherme est susceptible d'être sédentarisé dans le système digestif d'un vertébré poecilotherme.

Dans l'étude présentée, nous nous sommes proposés un double but : d'une part délimiter les risques de contamination d'un poisson absorbant une alimentation contaminée par des Entérobactéries normalement hôtes du tractus digestif de vertébrés supérieurs, d'autre part analyser le rôle de facteurs intervenant lors de ce transit et susceptibles de modifier l'évolution de cette microflore.

PREMIERE PARTIE

CONTAMINATION EXPERIMENTALE DES POISSONS PAR LES ENTEROBACTERIES

1. INTRODUCTION

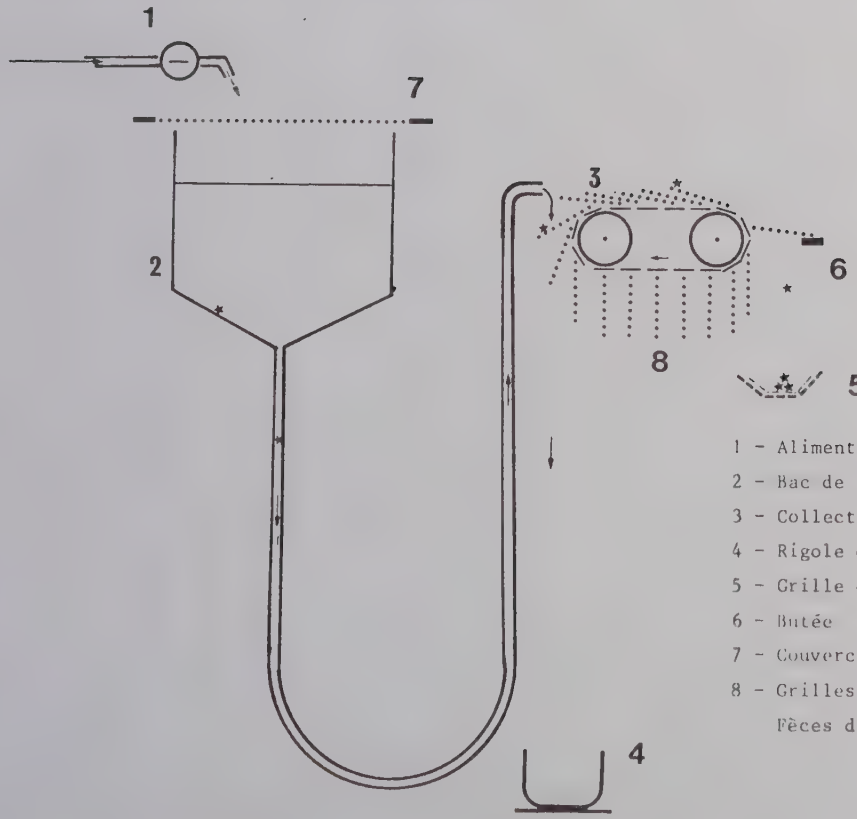
De nombreuses études ont montré que le poisson héberge fréquemment des Entérobactéries. Germes de contamination ou germes saprophytes ? Les avis s'accordent pour considérer que la mise en évidence d'Entérobactéries traduit un passage antérieur du poisson dans une zone polluée (GUELIN, 1962). LESEL et LE JEUNE (1980) ont montré que des sujets en contact pendant une heure avec une eau polluée par diverses entérobactéries pathogènes pour les vertébrés homéothermes, restent porteurs de ces entérobactéries durant 48 heures. La commercialisation de poissons d'élevage conformes aux normes sanitaires, prouve que la possibilité de contamination des sujets d'élevage par une onde polluée n'est pas négligeable. Cette source de contamination n'est cependant pas unique : TRUST (1971) a montré que des aliments commerciaux pour poissons contenaient une microflore bactérienne relativement importante, comportant entre autres des Enterococcus et des membres de la famille des Enterobacteriaceae parmi lesquelles des Salmonella. Une telle présence constitue un danger potentiel pour le personnel des élevages mais aussi les populations humaines et animales situées à l'aval des pisciculture. L'étude entreprise a pour objet de préciser la durée pendant laquelle les poissons sont susceptibles de rester porteurs d'Entérobactéries absorbées au moment de l'absorption de nourriture.

2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

2.1 Principe

Il s'agit de déterminer le temps pendant lequel des truites rejettent des bactéries de contamination absorbées à l'occasion d'un repas; la contamination est effectuée par distribution d'un granulé alimentaire réalisé extemporanément, contenant une Entérobactérie marquée associée à un indicateur de transit.

Fig. 1 - Collecteur automatique de fèces.



1 - Alimentation en eau de Nivelle
2 - Bac de stabulation
3 - Collecteur de fèces
4 - Rigole d'évacuation
5 - Grille de collecte
6 - Butée
7 - Couvercle grillagé
8 - Grilles mobiles
Fèces du poisson

2.2 Matériel (Fig. 1 et 2)

Les poissons utilisés sont des truites arc-en-ciel Salmo gairdneri Richardson, élevées en pisciculture et dont la taille varie de 15 à 25 cm. Elles sont placées par groupe de 4 ou 5 dans des bacs cylindroconiques de 38 cm de diamètre et 40 cm de hauteur. A la sortie de chacun des bacs sont placés des collecteurs de fèces (CHOUBERT et al., 1979) assurant un ramassage rapide de celles-ci qui se trouvent ainsi soustraites au délitage consécutif à un séjour prolongé dans l'eau.

L'eau d'alimentation provient de la Nivelle, rivière côtière du Pays Basque. Les eaux ayant transité dans le bac sont rejetées sans possibilité de repasser dans les installations expérimentales.

2.3 Techniques microbiologiques

Trois souches rendues résistantes à la streptomycine ont été utilisées après culture sur milieu liquide de Niven (RAIBAUD et al., 1966) :

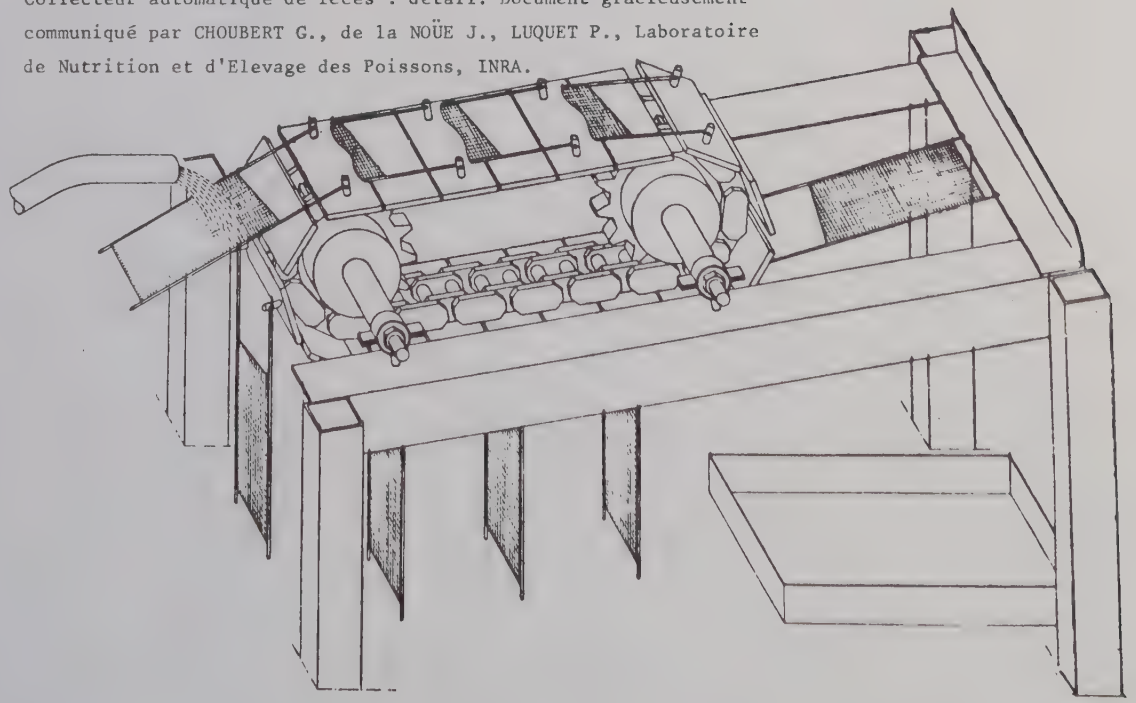
- Escherichia coli 207-77 (Institut Pasteur)
- Salmonella typhimurium 1322-74 (Institut Pasteur)
- Serratia sp. 5A 1a (Institut Pasteur)

Chacune des souches a été testée à plusieurs températures. Les résultats présentés concernent ceux obtenus à 9° C ± 1° C (E. coli, S. typhimurium, Serratia) et 6° C (Serratia).

Les souches d'Entérobactéries ont été utilisées incorporées au granulé alimentaire (annexe 1), en même temps qu'une suspension de spores de Bacillus stearothermophilus streptomycino-résistantes, servant d'indicateur de transit (CONTREPOIS et GOUET, 1969)

La collecte commence dès l'administration du granulé marqué, s'effectue à des intervalles de temps variables et dure au moins quatre jours. Le dénombrement de la microflore totale aérobie et anaérobie facultative est effectué sur milieu TVG1P (LESEL M., 1976); celui des entérobactéries de contamination est effectué sélectivement en boite de Pétri sur milieu DPTS (FOURNAUD et MORAND-FEHR, 1965), additionné de 0,1 ml de streptomycine à 100 mg/l et incubé 5 jours à 37° C (annexe 2). Le même milieu DPTS a été utilisé pour dénombrer la microflore à GRAM négatif de l'eau, les souches bactériennes s'y développant étant repiquées sur KLIGLER de façon à différencier les Entérobactéries présentes dans l'eau.

Fig. 2 - Collecteur automatique de fèces : détail. Document gracieusement communiqué par CHOUBERT G., de la NOÜE J., LUQUET P., Laboratoire de Nutrition et d'Elevage des Poissons, INRA.



Les spores de Bacillus stearothermophilus sont obtenues et dénombrées (annexe 2) suivant les techniques décrites par CONTREPOIS et GOUET (1969). Lorsque les prélèvements de fèces sont indemnes d'Entérobactéries ainsi que de spores indicatrices de transit, toutes les truites sont sacrifiées et la présence éventuelle de corps bactériens est recherchée au niveau des divers organes (tractus digestif, branchies, rein, peau) en utilisant les techniques de prélèvement et ensemencement définies par LESEL M. (1976).

3. RESULTATS

Les résultats du dénombrement des spores et des entérobactéries dans les fèces des poissons collectées à divers intervalles de temps sont représentés figures 3 à 6. Dans les séries réalisées à 9° C, il apparaît que l'élimination des spores et des bactéries se produit dès la première heure, passe par un minimum vers la cinquième heure, le maximum étant atteint vers la huitième heure. La quantité de corps bactériens décroît ensuite régulièrement dans les fèces. A 6° C, les mêmes phases sont observées, le minimum durant jusqu'à la dixième heure, le maximum étant atteint vers la vingtième heure. Les équations des droites de régression de la décroissance de ces rejets ont été calculées et leur parallélisme testé par comparaison des pentes (analyse de covariance, SNEDECOR et COCHRANE, 1969).

Les tests montrent que l'excrétion des corps bactériens dans la phase de décroissance peut être assimilée à une droite (coefficients de régression voisins de -1). Il n'y a pas de différences significatives entre les pentes des droites concernant l'élimination des spores à 9° C (test de F non significatif à 5%) ni entre celles-ci et la pente de la droite de régression à 6° C (test de F non significatif à 5%). Par contre, l'élimination des entérobactéries s'effectue à des vitesses différentes; à 9° C, la diminution de Salmonella et Serratia dans les fèces est comparable, alors qu'elle est significativement différente pour E. coli à 2,5%. Comparées au marqueur bactérien sporulé, E. coli à 9° C et Serratia à 6° C ont des pentes non significativement différentes (NS à 5%).

A 6° C, alors que la disparition a été notée 78 h après absorption du repas marqué, Serratia réapparaît dans les fèces à une concentration élevée, 121 h et, à un degré moindre, 134 h après.

Les courbes d'excrétion cumulées à 9° C des trois taxons ainsi que celles des spores sont représentées figures 7 à 9. Sauf dans le cas de Serratia, les taux de récupération sont relativement faibles : 25% pour S. typhimurium et

Fig. 3 - Evolution de la concentration bactérienne dans les fèces : Escherichia coli.

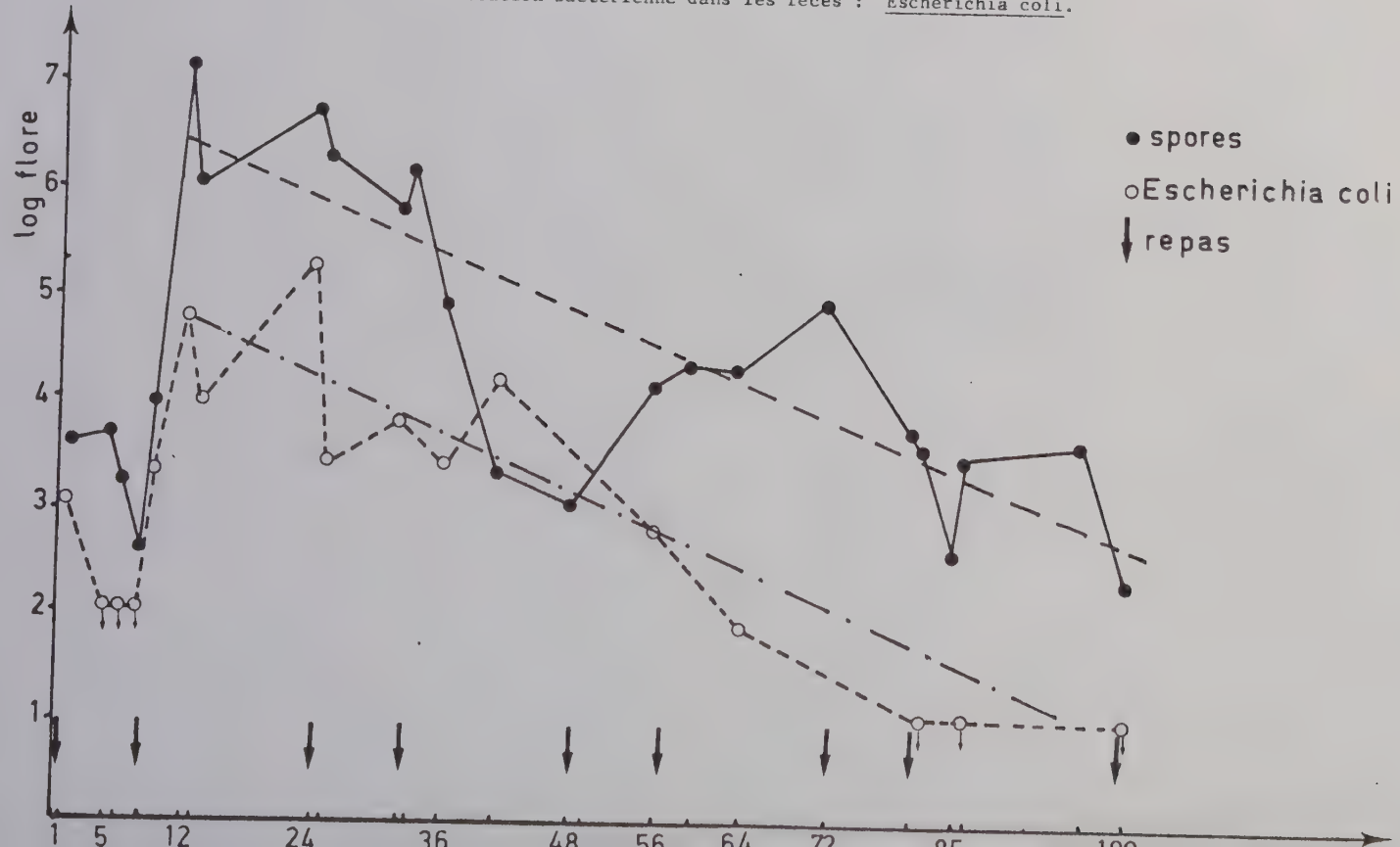


Fig. 4 - Evolution de la concentration bactérienne dans les fèces : Salmonella typhimurium.

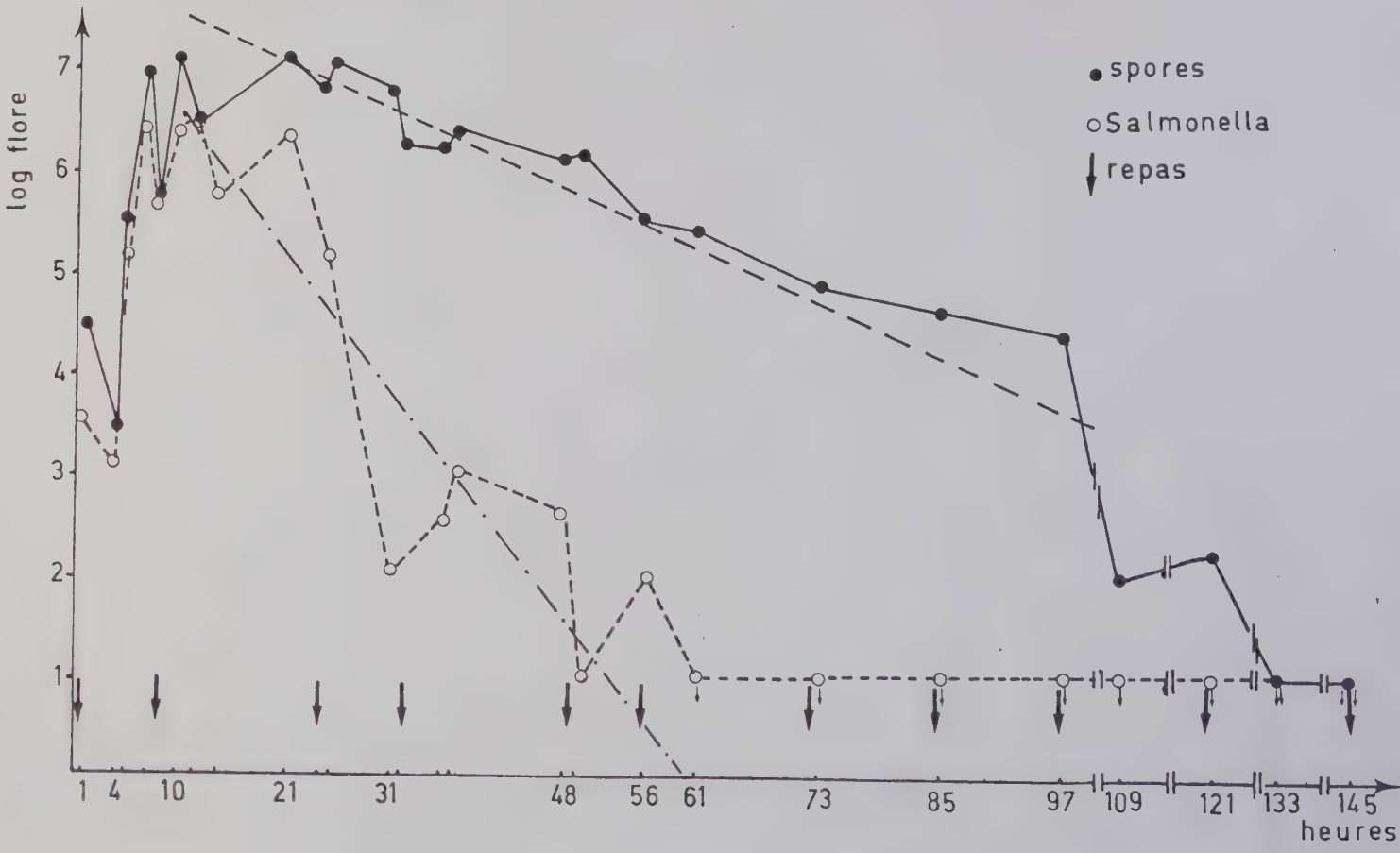
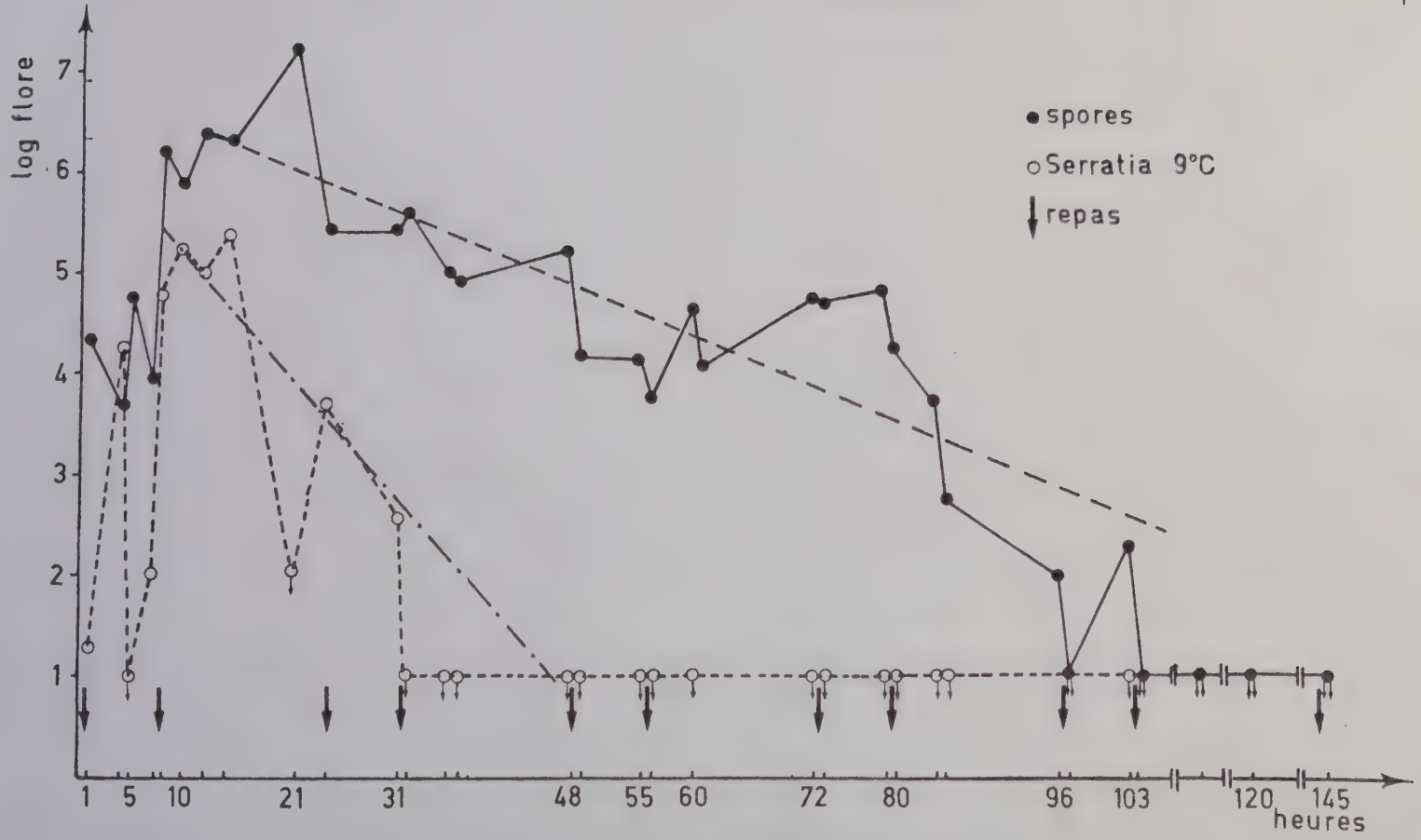


Fig. 5 - Evolution de la concentration bactérienne dans les fèces ; Serratia sp. 9° C.



2,5% pour E. coli. En aucun cas il n'a été possible de retrouver d'entérobactéries marquées ou de spores de Bacillus sur les échantillons prélevés sur les sujets abattus en fin d'expérience.

4. DISCUSSION

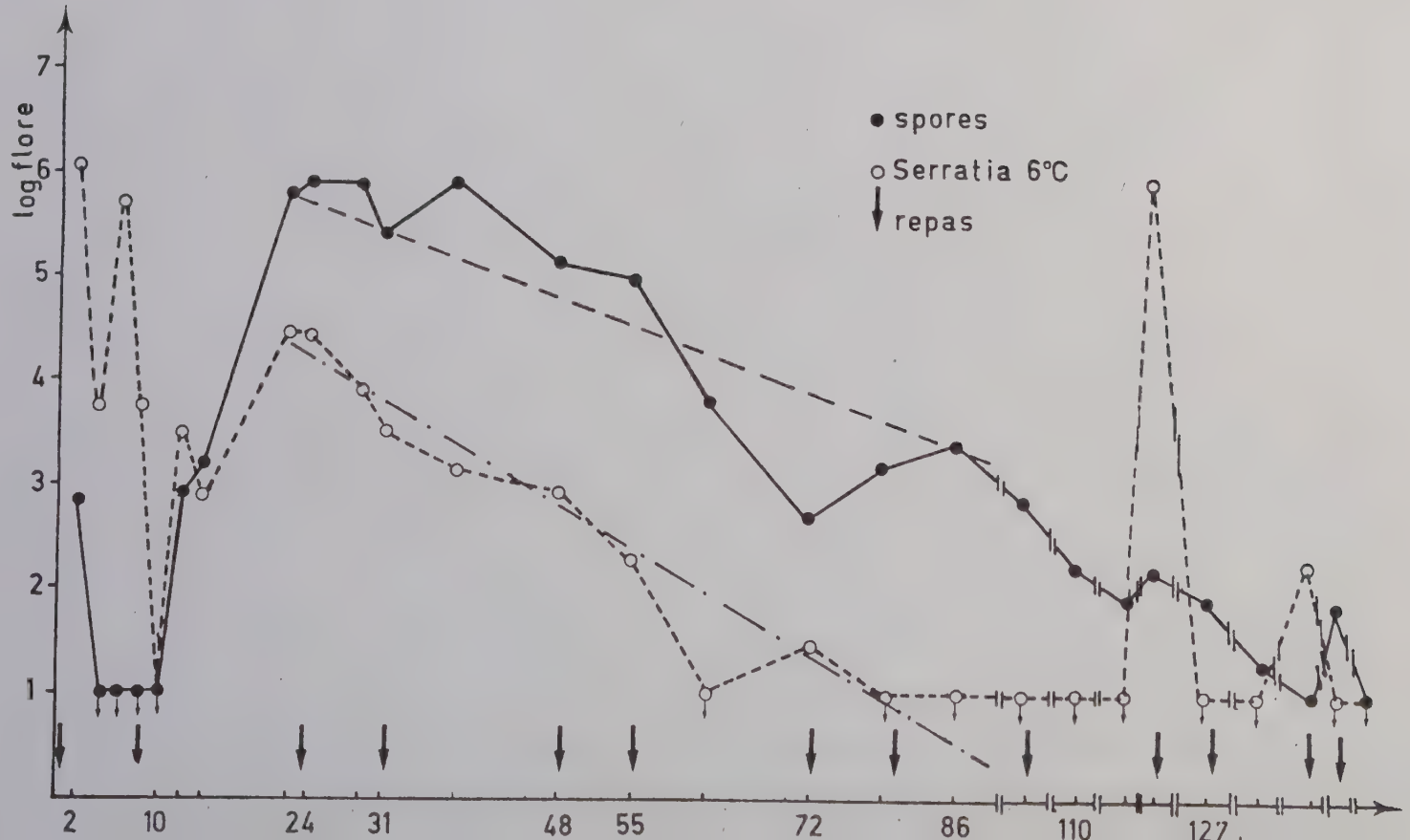
4.1 Caractéristiques du transit bactérien

Le transit digestif des corps bactériens chez la truite arc-en-ciel ne s'effectue pas comme celui décrit pour la phase solide du repas par POSSOMPES et al. (1975). LESEL et SECHET (sous presse), à partir d'informations obtenues chez le rat (DERBLOM et al., 1966 ; POULAKOS et KENT, 1973), le chien (SUMMERS et al., 1976) et l'homme (JIAN et al., 1979) ont émis l'hypothèse que les corps bactériens chez le poisson sont susceptibles d'accompagner la phase liquide. Les résultats obtenus confirment cette hypothèse; l'apparition précoce des spores de Bacillus, mais aussi des Entérobactéries marquées, dans les fèces des poissons montre que le front du repas bactérien parcourt très rapidement l'intestin et est évacué dès la première heure. Au cours de la phase inter-prandiale, le marqueur se répartit de façon relativement homogène le long de l'intestin. Le début de la vidange gastrique de la phase solide entraîne l'apparition d'un second front du repas bactérien aisément repérable dans les fèces. Puis la concentration du marqueur dans les fèces diminue en fonction des apports d'origine stomacale (repas ultérieurs), ainsi que l'indiquent les régressions calculées.

4.2 Influence du taxon

Cette vitesse de transit paraît être modulée selon le taxon bactérien étudié. Spores de Bacillus, Salmonella, Escherichia ou Serratia ne sont pas éliminées au même rythme dans les fèces. Les spores dont la vitesse d'excrétion est la même dans toutes les séries, constituent un bon témoin de référence pour les autres taxons. On retrouve donc un comportement de corpuscules bactériens identique à celui décrit par DUCLUZEAU et al. (1970) chez la souris holoxénique. La différence de vitesse d'excrétion entre 6 et 9° C observée pour les Serratia, l'identité des pentes entre Serratia 6° C, E. coli 9° C et les spores dans toutes les séries suggèrent une interaction entre température et transit bactérien. La souche de Serratia utilisée cesse de se multiplier vers 6° C, E. coli ne poussant pas au-dessous de 15° C. Nous n'avons pas déterminé ce qu'il en était pour la souche de Salmonella; HEUSCHMANN-BRUNNER (1974) estime que S. typhimurium se

Fig. 6 - Evolution de la concentration bactérienne dans les fèces : Serratia sp. 6° C.



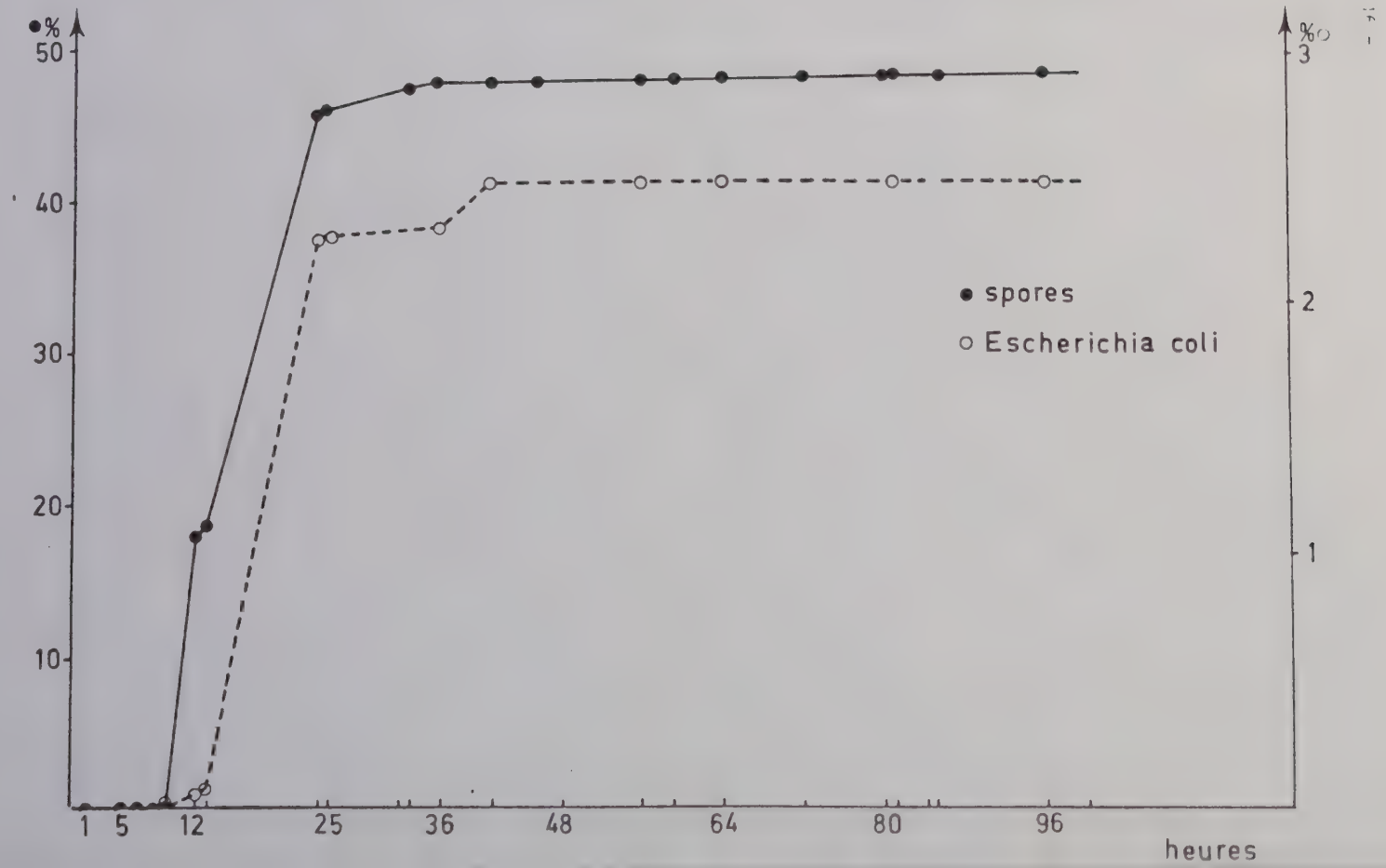
multiplie chez le poisson à 9° C et provoque des entérites. On peut penser qu'en dessous d'une température minimum de croissance, les corps bactériens à l'état végétatif migrent à la même vitesse que les spores de Bacillus. Les expérimentations ayant été réalisées à deux températures basses mais relativement voisines, on ne peut déterminer dans l'immédiat si le phénomène observé traduit un comportement caractéristique des corps bactériens associés à la phase liquide du bol alimentaire ou plus simplement un ralentissement de la motricité gastrique et intestinale des poissons sous l'effet du froid.

4.3 Facteurs du transit et leur influence sur la multiplication

L'examen des courbes d'excrétion cumulée des corps bactériens montre que les conditions de leur récupération dans les fèces ne sont pas totalement satisfaisantes. Le taux de récupération des spores de Bacillus est, selon les séries, de 30, 50 et 250%. Dans les deux premiers cas on peut admettre qu'une partie de ces spores a été lysée lors du transit digestif; CONTREPOIS et GOUET (1969) admettent cette explication chez les ruminants. Par contre, chez la truite arc-en-ciel (LESEL et SECHET, sous presse), la récupération est voisine de 100% lorsque la récolte se fait par abattage des sujets. Ces fluctuations quantitatives du marqueur, dont on a pu apprécier la constance du comportement dans le tractus digestif avec chacune des séries, peuvent s'expliquer par la difficulté d'obtenir une répartition homogène des corps bactériens dans le repas marqué, la relative imprécision de la technique de dénombrement utilisée, mais aussi un éventuel passage rapide d'une fraction du marqueur dans l'eau du bac après émission des fèces.

Le pourcentage d'Entérobactéries collectées est variable. Dans tous les cas, le pourcentage récupéré est plus faible que celui du marqueur. Le pH acide et les enzymes gastriques sont susceptibles de provoquer une lyse bactérienne importante (MORIARTY, 1973 ; BOWEN, 1976) permettant aux poissons (Tilapia nilotica Sarotherodon mossambicus) de digérer les bactéries apportées par l'alimentation. L'importance de cette lyse est variable selon les taxons bactériens ; pour S. typhimurium, comparée aux spores, elle affecte un peu plus de 10% de la population, indiquant qu'une faible fraction de la population est susceptible d'être détruite. A l'inverse, il ne subsiste que 5% d'E. coli dans les mêmes conditions; l'importance de la fraction détruite paraît considérable étant donné les caractéristiques de ce taxon très adapté aux conditions du milieu gastrointestinal. GUELIN (1952) a mis en évidence le rôle des bactériophages sur les bactéries

Fig. 7 - Courbe cumulée de la concentration bactérienne excrétée dans les fèces : Escherichia coli.



entériques des poissons de mer; pour E. coli en particulier, la diminution est particulièrement rapide chez Ctenolabrus rupestris et intervient dans les 24 heures suivant la contamination. Selon cet auteur, les entérobactéries de l'homme et celles des vertébrés homéothermes ne peuvent être abondantes dans la flore digestive des poissons, lorsque les bactériophages spécifiques sont présents. De plus, en eau douce comme en eau de mer (GUELIN ET CABIOCH, 1972), des micro-prédateurs bactériens sont susceptibles de lyser les E. coli apportés par les eaux polluées. Indépendamment de toute éventuelle activité bactériostatique imputable soit à la microflore du tube digestif (HAVENS et DEHLER, 1923), soit aux excrétions d'origine algale (GELDREICH et CLARKE, 1966), il a pu se trouver dans l'eau d'alimentation d'origine fluviale un microprédateur spécifique d'E. coli ayant entraîné la lyse de la plus grande partie des bactéries marquées introduites.

La réapparition de Serratia dans les fèces à 6° C reste inexplicable. L'établissement d'un équilibre dynamique entre la souche introduite et un micro-prédateur peut être évoquée, mais sa recherche n'a pas été faite. Cependant, un tel équilibre implique la multiplication de Serratia dans le tube digestif de la truite arc-en-ciel. Les résultats d'étude du transit et les caractéristiques thermotrophiques de la souche utilisée excluent une telle éventualité que GELDREICH et CLARKE (1966) considèrent comme possible, mais à des températures supérieures à 16 °C. L'absence d'Entérobactéries marquées ainsi que des spores de Bacillus dans les échantillons prélevés sur les poissons en fin d'expérience, montre que l'élimination est totale et rend très improbable la réapparition du taxon consécutive à une multiplication.

4.4 Les facteurs de la réceptivité

Les résultats obtenus au cours des essais montrent que, chez des sujets parfaitement acclimatés, les entérobactéries de contamination ne sont pas susceptibles de se fixer et de se multiplier. Ces résultats sont conformes aux observations de MATTHEIS (1964) et LESEL et LE JEUNE (1980). GELDREICH et CLARKE (1966) ont montré que chez 132 poissons appartenant à 14 espèces différentes la multiplication pouvait intervenir au-dessus de 16° C, les sujets restant porteurs pendant 9 à 14 jours. HEUSCHMANN-BRUNNER (1974) observe qu'en milieu fortement pollué ou confiné, les salmonelles se multiplient chez le poisson qui les héberge pendant longtemps; au bout d'un temps variable, une pathologie intestinale peut être observée, tandis que les bactéries de contamination passent la barrière intestinale. JANSSEN (1970) insiste sur la signification des essais de contamination

Fig. 8 - Courbe cumulée de la concentration bactérienne excrétée dans les fèces : Salmonella typhimurium.

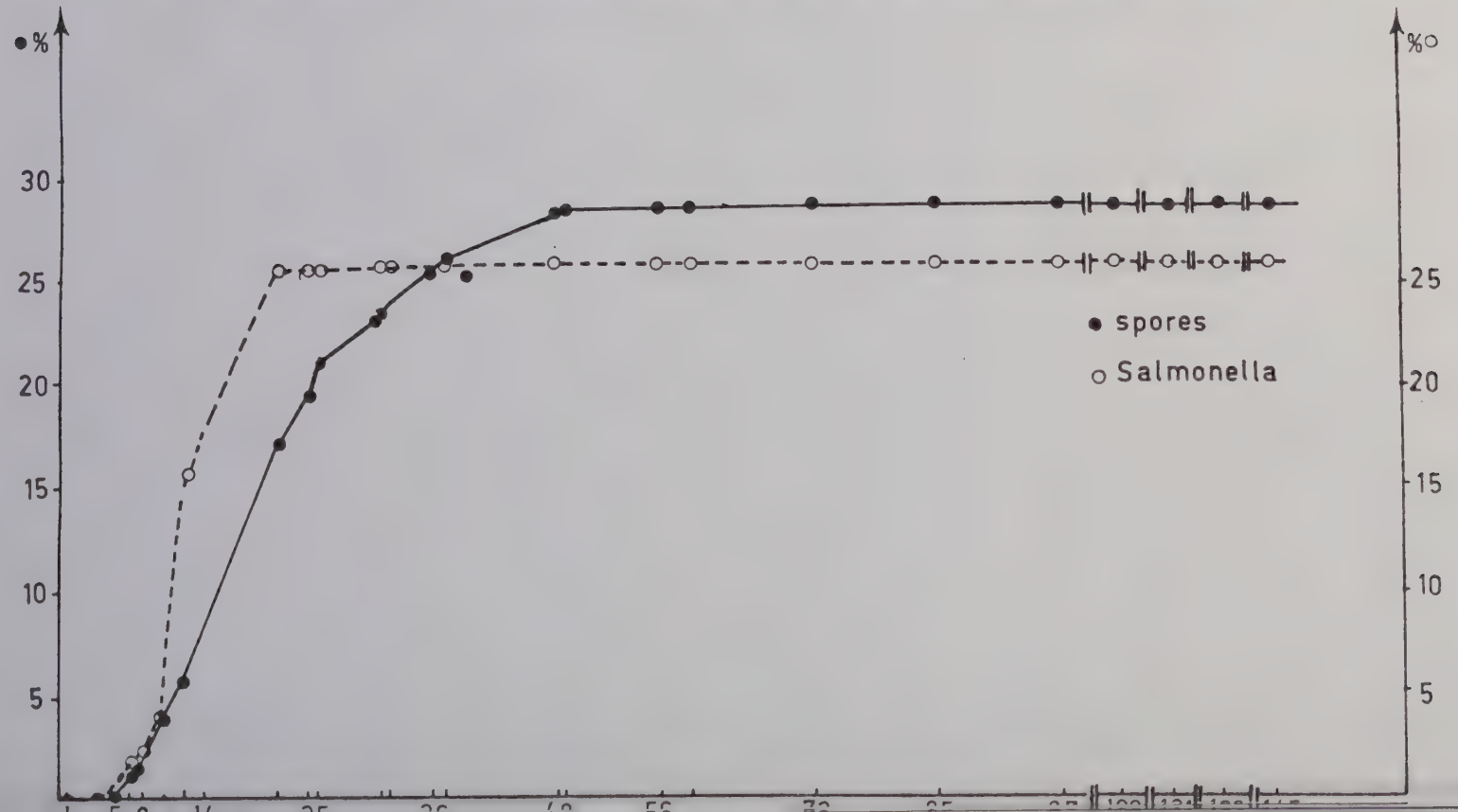
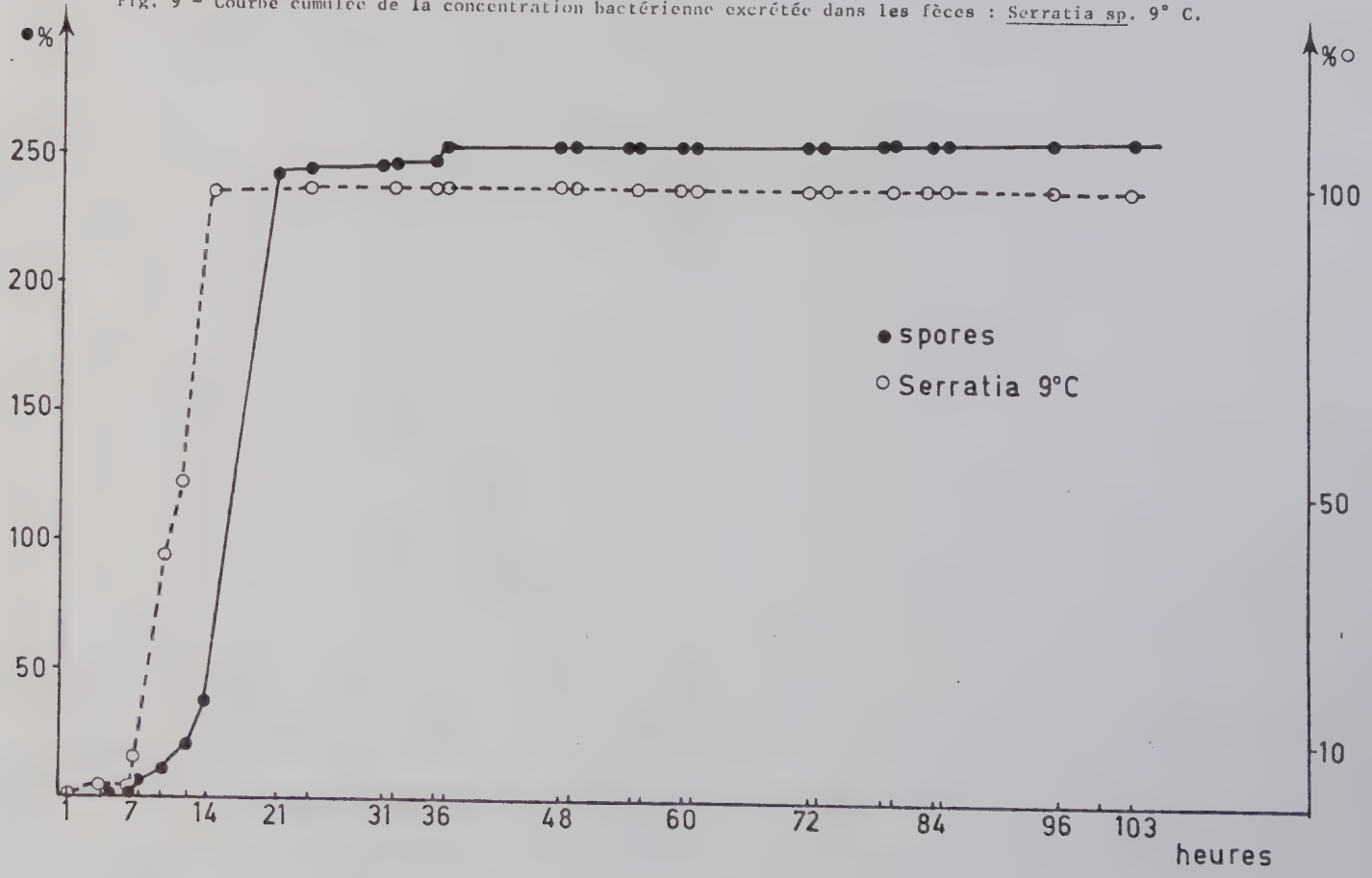


Fig. 9 - Courbe cumulée de la concentration bactérienne excrétée dans les fèces : Serratia sp. 9° C.



réalisée expérimentalement; même des agents ichtyopathogènes connus peuvent ne p provoquer d'infection chez le poisson sous des conditions expérimentales (SNIES 1964). L'infection directe de la perche blanche par contact avec une eau conta minée ne se produit qu'à la condition préalable d'acclimater le poisson à 5° C puis de le soumettre à une augmentation progressive de la température jusqu'à 23° C en 24 h, en même temps qu'il baigne dans une eau contenant environ 100 000 germes bactériens par millilitre. L'agression thermique couplée à la contamina provoque la mort du poisson en quelques jours (JANSSEN, 1970). Tout comme on pe l'observer sur la microflore saprophyte des vertébrés homéothermes (TANNOCK et SAVAGE, 1974) mais aussi des poissons (LESEL et SECHET, sous presse), les agress du milieu sont responsables de l'apparition de troubles pathologiques. De même les lésions tégumentaires sont des voies d'entrée privilégiées dans le milieu in rieur du poisson pour les Salmonelles (HEUSCHMANN-BRUNNER, 1974). La sensibili des poissons à la présence de cette microflore de contamination est démontrée pa l'existence de réactions antigéniques chez des espèces vivant en milieu pollué par une forte densité humaine; ainsi JANSSEN et MEYERS (1968) ont mis en évidenc des anticorps spécifiques pour diverses bactéries pathogènes de l'homme dans le serum de la perche blanche, Roccus americanus.

Il apparaît donc clairement que la réceptivité du poisson à une contamina est fonction de la durée de cette contamination, de son intensité et des agress subies par le sujet. Un poisson en état de faiblesse (maladie, blessure, altéra tion des caractéristiques du milieu ...) peut être considéré comme un révélateu potentiel d'une pollution de l'eau par des Entérobactéries provenant de vertébré homéothermes.

5. CONCLUSIONS

De l'étude du transit des Entérobactéries terrigènes susceptibles de conta miner le poisson, il apparaît que :

- compte tenu des conditions du transit de ces bactéries dans le tractus digest la dissémination de celles-ci peut intervenir très vite après leur absorption;
- chaque taxon bactérien paraît avoir une vitesse de transit qui lui est propre
- les conditions physico-chimiques rencontrées dans les compartiments digestifs peuvent avoir un effet limitant sur cette microflore exogène sans pourtant entra ner sa disparition;
- aucun trouble pathologique n'a été observé; ce fait peut être imputable à la bonne condition physique des sujets au moment de l'expérimentation.

DEUXIEME PARTIE

FACTEURS LIMITANTS DE LA SURVIE DES ENTEROBACTERIES LORS DU TRANSIT DIGESTIF

I. INTRODUCTION

Les résultats obtenus dans la première partie montrent que les entérobactéries choisies ne paraissent pas trouver, aux basses températures chez la truite arc-en-ciel, un milieu favorable à leur multiplication. Or le poisson, vertébré poecilotherme, étroitement assujetti à la température du milieu dans lequel il vit, est susceptible de se trouver dans des conditions thermiques permettant le développement de bactéries (LESEL et PERINGER, 1981).

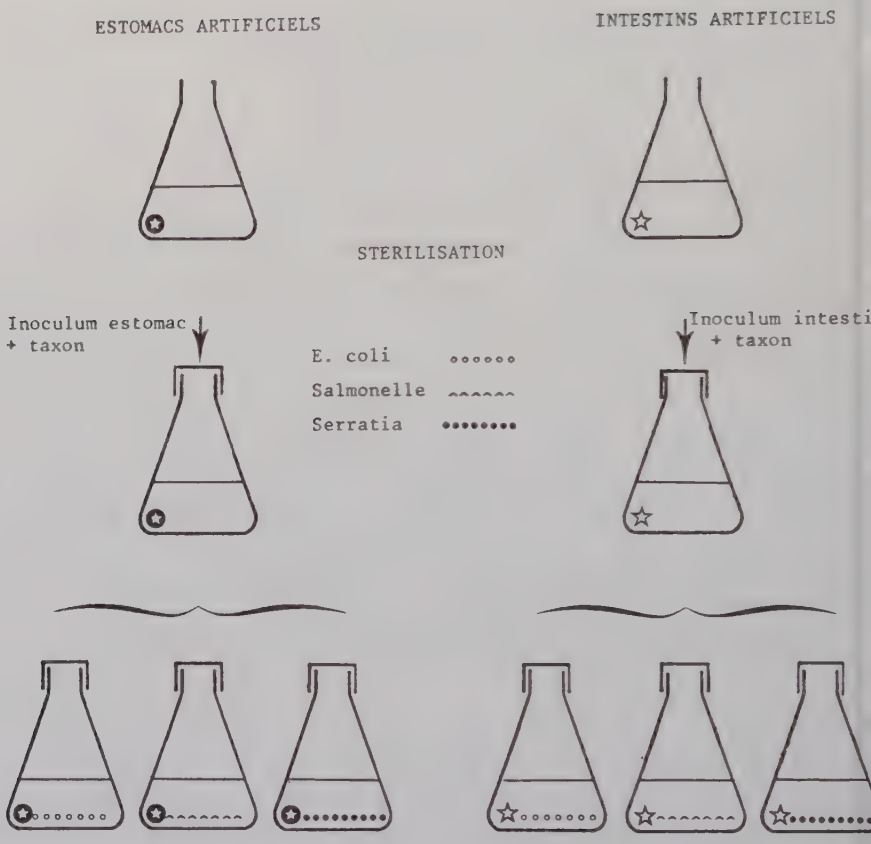
GELDREICH et CLARKE (1966) estiment qu'en dessous de 10° C, aucune multiplication des microorganismes de contamination ne peut se produire dans le tube digestif sur une période de trois jours; à 20° C, une croissance importante de streptocoques fécaux intervient en moins de 48 heures. La température apparaît donc comme un facteur déterminant du développement des microflores saprophytes et de contamination.

Dans l'étude qui suit, nous avons tenté de préciser quels peuvent être les effets de quelques facteurs caractéristiques du milieu digestif combinés à ceux de la température sur la survie des entérobactéries associées à la microflore digestive normale du poisson.

2. CONDITIONS EXPERIMENTALES

2.1 Les facteurs contrôlés

Au cours du transit dans les compartiments digestifs, les divers taxons bactériens arrivés per os et accompagnant le bol alimentaire sont susceptibles d'évoluer de trois façons : se développer, survivre ou disparaître. Suivant les compartiments, les paramètres pouvant modifier les caractéristiques de cette microflore sont différents; l'acidité gastrique constitue le facteur dominant



10° C	+	+	+	+	+	+
17° C	+	+	+	+	+	+
24° C	+	+	+	+	+	+
30° C	+	+	+	+	+	+
37° C	+	+	+	+	+	+

Fig. 10 - Réalisation des compartiments digestifs artificiels et conditions d'incubation.

du premier compartiment. La présence de sels biliaires dans l'intestin a pour effet d'inhiber le développement de la microflore GRAM + ; les entérobactéries sont susceptibles de se développer considérablement dans les conditions propres à ce compartiment. L'effet thermique, facteur extérieur à l'animal-hôte, s'exercera sur les populations bactériennes en se superposant aux effets de l'action des facteurs physico-chimiques du tractus digestif.

Les caractéristiques thermotrophiques des souches disponibles imposaient une expérimentation in vitro, la truite arc-en-ciel ne supportant pas des températures supérieures à 25° C. En conséquence, nous avons réalisé des compartiments digestifs artificiels dénommés respectivement "estomac artificiel" (EA) et "intestin artificiel" (IA) où sont reproduites les caractéristiques dominantes des réservoirs digestifs de la truite [+]. La croissance des Entérobactéries de contamination a été suivie dans ces réservoirs à des températures comprises entre 10° C et 37° C.

2.2 Les réservoirs digestifs artificiels

Nous avons admis que les besoins nutrionnels potentiels des bactéries dans le tube digestif peuvent être intégralement couverts par le granulé alimentaire distribué au poisson. Les facteurs physico-chimiques s'exercent de façon permanente, l'activité bactérienne n'ayant pour limites que celles de son propre développement en milieu confiné.

2.2.1 Les facteurs physico-chimiques (fig. 10)

Les récipients utilisés sont des flacons en verre de 125 ml avec bouchage à vis.

- Estomacs artificiels (EA)

Chaque flacon EA contient 50 ml de la préparation suivante :

. aliment commercial granulé "Truite arc-en-ciel" : 40 g

. tampon pH 4,2 (annexe 3) qsp : 1000 cm^3

Le pH stabilisé du milieu est 4,3.

[+] La mise au point des compartiments digestifs artificiels EA et IA a été effectuée par Madame Michèle LESEL dans le cadre d'une étude des caractéristiques fonctionnelles de la microflore du tube digestif de la truite arc-en-ciel.

Tableau I : COMPOSITION DE LA FLORE BACTERIENNE DES INOCULUMS

Analyse effectuée sur 24 colonies prélevées et isolées de
boites de dénombrement des contenus stomacaux et intestin

	ESTOMAC	INTESTIN
Corynebacterium groupe I Bergey	1	4
Corynebacterium groupe II Bergey	3	5
Enterobacteries	5	8
Acinetobacter	1	2
Pseudomonas	3	2
Xanthomonas	1	0
Aeromonas	7	0
non poussé	3	3

- Intestins artificiels (IA)

Chaque flacon IA contient 50 ml de la préparation suivante :

. aliment commercial granulé "Truite arc-en-ciel" : 40 g
. désoxycholate de sodium : 1 g
. tampon pH 7,2 qsp : 1000 cm^3

Le pH stabilisé est de 7,5.

15 flacons EA et 15 flacons IA ont été ainsi préparés et stérilisés à 118° C pendant 20 mn et ont reçu un inoculum bactérien représentatif de la microflore saprophyte du tube digestif.

2.2.2 Les facteurs microbiologiques

2.2.2.1 Microflore saprophyte

Afin d'obtenir une microflore digestive représentative, des truites arc-en-ciel, nourries régulièrement deux fois par jour et vivant dans un environnement connu et contrôlé, sont sacrifiées par immersion après capture dans une solution à 500 mg/l de tricaïne méthane sulfonate (MS 222). Dans ces conditions, les truites meurent rapidement sans mouvements brusques susceptibles de provoquer un déplacement des contenus alimentaires dans les compartiments digestifs. Le tractus digestif est rapidement mis à jour et l'estomac et l'intestin sont prélevés stérilement, fendus sur toute leur longueur, vidés de leur contenu et les parois sont grattées de manière à récupérer les corps bactériens inclus dans le mucus. Ces contenus digestifs, stomacaux d'une part, intestinaux d'autre part, sont dilués au tiers, puis broyés. A chaque flacon EA est inoculé 1 ml du broyat intestinal. A l'issue de cette opération, chaque flacon contient par ml de suspension 0,0066 ml du milieu digestif des truites, destiné à constituer la microflore saprophyte digestive. La microflore totale de ces inoculums est de :

- contenus stomacaux : 3×10^3 corps bactériens/ml
- contenus intestinaux : 2×10^4 corps bactériens/ml

L'identification des taxons bactériens présents dans ces inoculums a été effectuée suivant la méthode décrite par LESEL M. (1976). Cependant, compte tenu du fait que l'inoculum provient du mélange de plusieurs contenus digestifs, 24 colonies au lieu de 12 ont été prélevées pour identification (Tableau 1).

Afin de contrôler l'évolution quantitative des populations bactériennes dans les flacons, une suspension de spores de B. stearothermophilus streptomycino-résistante est ajoutée à chacun des inoculums.

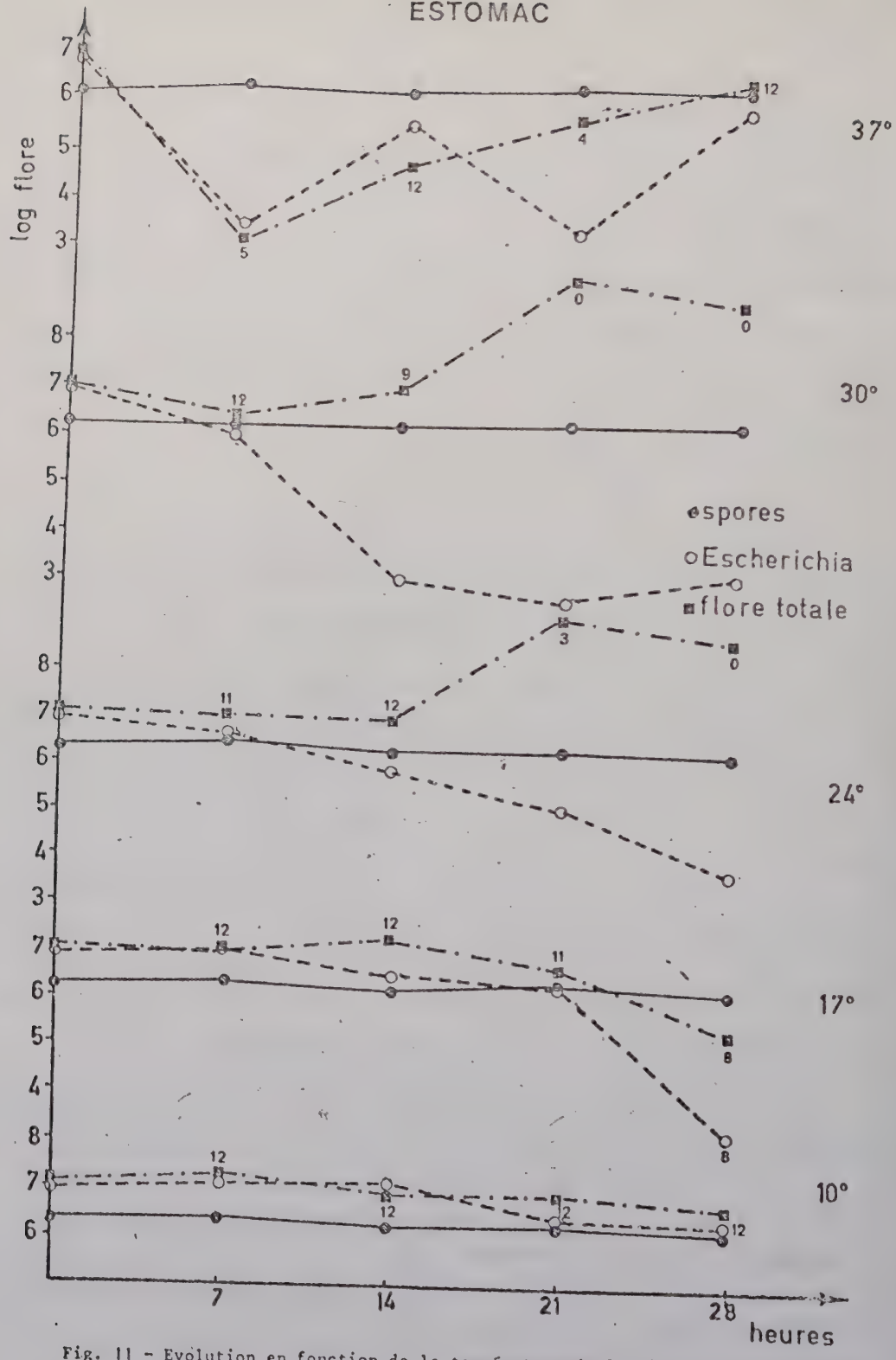


Fig. 11 - Evolution en fonction de la température de la microflore bactérienne dans les estomacs artificiels : cas d'Escherichia coli.

n nombre de souches de contamination retrouvées sur 12 isolements
(légende commune aux figures 12 à 16).

2.2.2.2 Microflore de contamination

La microflore de contamination était constituée des trois souches d'Entérobactéries rendues streptomycino résistantes, utilisées dans la première partie, soit : Escherichia coli, Salmonella typhimurium et Serratia sp.

2.3 Modalités expérimentales

La croissance des entérobactéries et de la flore saprophyte a été testée à : 10° C, 17° C, 24° C, 30° C et 37° C pour chacune des souches choisies, les flacons étant régulièrement agités. L'inoculation se faisant à T = 0, les contrôles de croissance ont été réalisés à T + 7 h, T + 14 h, T + 21 h et T + 28 h. Les ensemencements ont été faits sur :

- milieu TVG1P : microflore totale
- milieu DPTS + streptomycine : entérobactéries de contamination
- milieu germination de spores.

La streptomycine dans le milieu DPTS est destinée à inhiber le développement des entérobactéries spontanément présentes dans la microflore digestive des poissons. Les caractéristiques de ces divers milieux sont celles des milieux utilisés dans la première partie.

Les boîtes de Pétri de dénombrement sont lues à 8 jours (TVG1P), 3-4 jours (DPTS), 2 jours (germination spores). Sur TVG1P, 12 souches sont repiquées pour identification et doivent permettre la détermination de l'identité des taxons qui se sont développés électivement dans les réservoirs artificiels.

3. RESULTATS

3.1 Caractéristiques générales

A l'intérieur d'une série, EA ou IA, on observe que les résultats au temps T = 0 sont identiques. On peut donc admettre que les conditions imposées par la densité de population microbienne sont comparables d'un flacon à l'autre. La constance du nombre de spores bactériennes dénombrées, tout au long des essais et dans tous les flacons, montre qu'aucun incident propre à la technique de manipulation et d'ensemencement des flacons n'est intervenu (dilution, homogénéisation..

La microflore totale dénombrée sur milieu TVG1P est toujours un peu plus élevée que celle obtenue sur milieu DPTS. Or l'identification des taxons montre que cette microflore est dominée, voire exclusivement composée, par la microflore de contamination. La différence observée paraît donc le plus souvent imputable

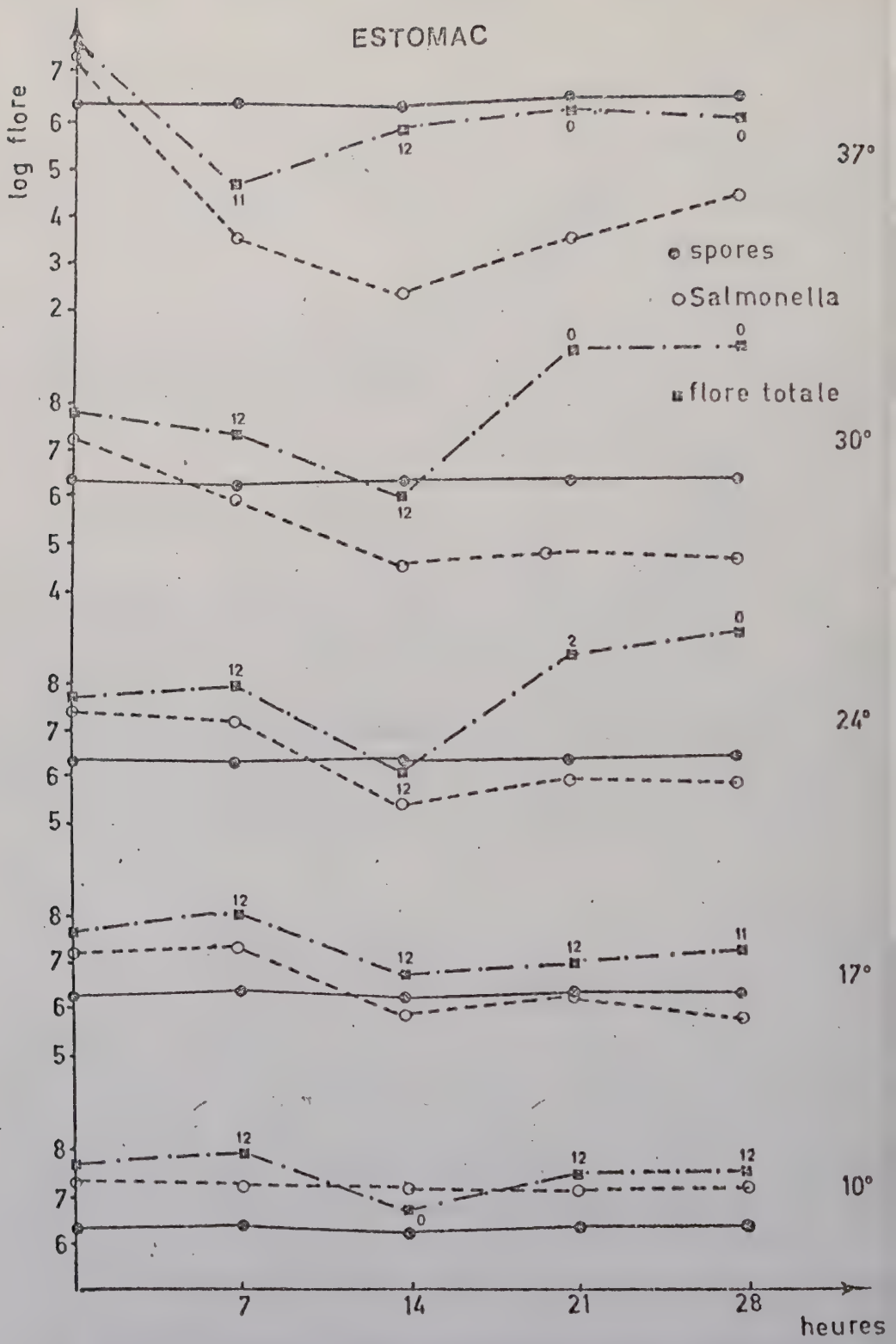


Fig. 12 - Evolution en fonction de la température de la microflore bactérienne dans les estomacs artificiels : cas de Salmonella typhimurium.

au caractère inhibiteur de la croissance du désoxycholate de sodium associé à celui de la streptomycine ; malgré les caractéristiques propres aux Entérobactéries et la sélection de populations streptomycino résistantes, cet effet reste repérable sur les souches utilisées.

Pendant les 14 premières heures la microflore totale est constituée exclusivement par les Entérobactéries de contamination. Pour tous les taxons et dans tous les réservoirs, il n'y a pas de croissance bactérienne décelable à 10° C. Aux autres températures, chaque taxon présente une courbe évolutive qui lui est propre, plus particulièrement dans l'estomac.

3.2 Croissance dans EA (fig. 11, 12, 13)

La croissance d'E. coli est caractérisée par l'importance des variations numériques de la population. De 17 à 30° C, on observe le développement progressif d'une Corynébactérie de la microflore saprophyte aux dépens d'E. coli, les deux taxons dominant tour à tour à 37° C. Avec S. typhimurium de 17 à 37° C, on note la même diminution numérique de l'entérobactérie de contamination en faveur de la Corynébactérie, le phénomène étant d'autant plus rapide que la température est la plus élevée. La même observation est faite avec Serratia sp. qui paraît moins sensible à 24 et 30° C ; à 37° C, et contrairement à ce qui est noté chez E. coli et S. typhimurium, Serratia diminue régulièrement mais sans développement concomitant de la microflore d'origine digestive.

De l'ensemble des observations faites dans les flacons EA, on peut retenir que le milieu acide a un effet limitant marqué sur les entérobactéries de contamination; cet effet est d'autant plus marqué que la température est plus élevée. Après un temps d'incubation suffisant (7h à 12h), des corps bactériens moins sensibles aux conditions dystrophiques du milieu paraissent pouvoir se développer (E. coli, S. typhimurium) mais cet effet n'est sensible qu'après un délai d'autant plus long que la température est plus basse. Enfin les niveaux de population atteints restent relativement peu importants (10^6 à 10^9).

3.3 Croissance dans IA (fig. 14, 15, 16)

Par comparaison avec EA, le résultat le plus marquant est la grande analogie entre les courbes de croissance des trois taxons. La multiplication des corps bactériens est détectable à partir de 17° C, le niveau maximum de population (10^{10}) étant atteint d'autant plus rapidement que la température est plus élevée. Les Entérobactéries de contamination sont en permanence dominantes et, en aucun cas, un taxon provenant de la microflore saprophyte n'a été identifié. Enfin,

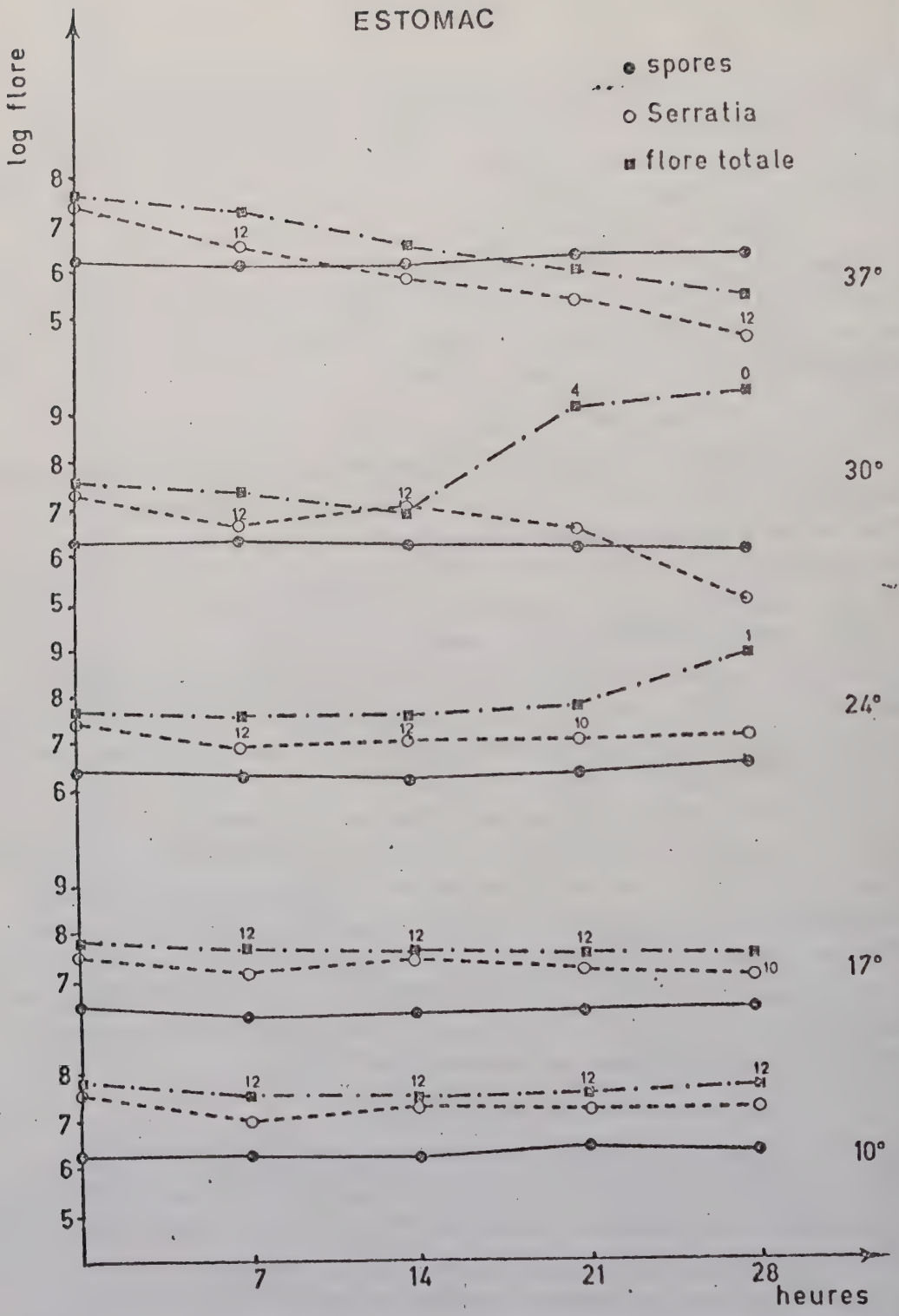


Fig. 13 - Evolution en fonction de la température de la microflore bactérienne dans les estomacs artificiels : cas de Serratia.

aucune fluctuation des niveaux de population n'est notée en fonction du temps d'incubation.

4. DISCUSSION

La reconstitution en milieu artificiel des conditions physico-chimiques observées in vivo est le plus souvent malaisée. Priorité est donnée à un paramètre défini au détriment de fait des autres. La réalisation de réservoirs digestifs artificiels n'échappe pas à cette règle et les résultats obtenus doivent être analysés en fonction d'observations faites à partir de sujets vivants.

4.1 Influence du milieu artificiel

Le flacon représentant le compartiment digestif est un système "fini" ; il est caractérisé par une absence totale de transit, l'apport nutritionnel intervenant lors de la préparation du réservoir. Il n'y a pas d'élimination ; en conséquence, les populations bactériennes après une colonisation rapide du milieu, subissent un ralentissement de croissance dû à l'épuisement de certains éléments nutritifs mais aussi à l'accumulation des produits d'excrétion métabolique. Cet aspect très classique a été observé de manière très nette dans les flacons IA. Le bouchage à vis des flacons entraîne l'absence complète de renouvellement de l'oxygène du milieu. Il convient donc de retenir qu'au bout d'un laps de temps difficile à apprécier, les conditions de l'aérobiose favorisant les bactéries aérobies strictes vont évoluer vers l'anaérobiose favorisant les bactéries anaérobies strictes susceptibles d'être présentes dans le tube digestif des poissons, mais surtout les bactéries anaérobies facultatives. On retrouve alors des conditions de développement analogues à celles observées dans le tractus digestif quand, la population ayant atteint un certain niveau de densité, la microflore aérobie ne trouve plus l'oxygène nécessaire à son métabolisme et est supplantée par les microflores anaérobie stricte et anaérobie facultative (LESEL et PERINGER, sous presse). Dans ce cas, les techniques de dénombrement sur boîte de Pétri n'assurent une numération cohérente que de la microflore anaérobie facultative. Les entérobactéries de contamination rentrent dans cette catégorie, de même d'ailleurs que la Corynébactérie devenue dominante dans EA. La disparition dans les compartiments artificiels des taxons repérés dans les tubes digestifs de truite indique clairement le caractère très simplifié de ce modèle artificiel.

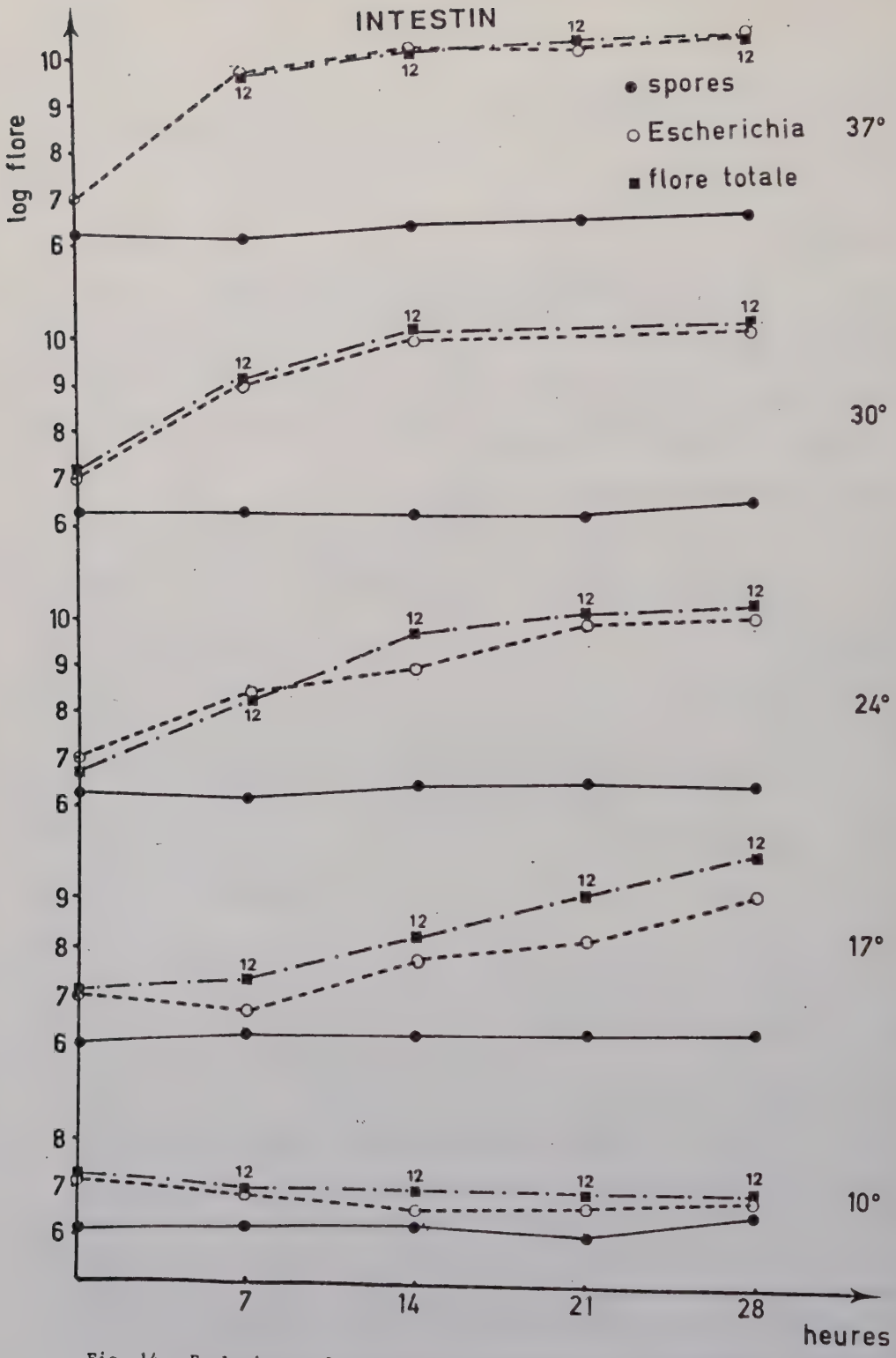


Fig. 14 - Evolution en fonction de la température de la microflore bactérienne dans les intestins artificiels : cas d'Escherichia coli.

L'interprétation prudente des résultats obtenus en compartiments digestifs artificiels est une règle observée par tous les auteurs. La réalisation et l'utilisation de tels compartiments nécessitent une analyse critique sévère des critères utilisés (CZERKAWSKI, 1976). Des travaux récents montrent qu'il est possible d'entreprendre des expérimentations de longue durée en rumen artificiel, au prix d'une complexité technique non négligeable (CZERKAWSKI et BRECKENRIDGE, 1977 et 1979). Ces techniques ne semblent pas encore avoir été développées chez les poissons. Sous réserve de mieux connaître les facteurs actifs, elles pourraient apporter d'intéressantes informations.

4.2 Influence des paramètres propres aux divers compartiments

4.2.1 Influence de la densité initiale de la microflore

Les conditions de l'ensemencement des flacons font que la microflore saprophyte est très peu abondante. Chez les poissons cette condition n'est sans doute jamais réalisée, même chez les sujets à jeun; en effet, MATTHEIS (1964), TRUST (1975), LESEL (1979) ont montré que, contrairement à ce qui est généralement admis (MARGOLIS, 1956 ; WOOD, 1967), le tube digestif des poissons héberge en permanence une microflore bactérienne. La flore de contamination est très probablement dans la majorité des cas relativement faible, comparée à la microflore hébergée; en conséquence, les rapports entre populations dans les flacons EA et IA sont sans doute sensiblement différents de ceux existant chez le poisson. Ce simple fait peut expliquer qu'un seul taxon de la microflore saprophyte ait pu se développer et devenir dominant après un temps d'incubation élevé (14 h - 21 h) dans les EA.

4.2.2 Influence du pH et des sels biliaires

Le pH acide du milieu stomacal constitue un facteur limitant efficace des trois entérobactéries testées. Il participe des facteurs barrières développés par l'hôte contre les bactéries exogènes (DUCLUZEAU et RAIBAUD, 1980). Ainsi que nous avons pu l'observer, l'acidité stomacale limite le développement bactérien et seuls les taxons acidophiles ou acido-tolérants sont susceptibles de se multiplier (cas de Corynebacterium I).

Les entérobactéries de contamination ont, à l'évidence, trouvé des conditions favorables à leur développement dans les IA. La faiblesse de l'inoculum en bactéries saprophytes explique l'absence totale de tout autre taxon dans les prélèvements réalisés après 7h, 14h, 21h et 28 heures. Le milieu intestinal, tel qu'il a été simulé dans les flacons, autorise la multiplication de E. coli,

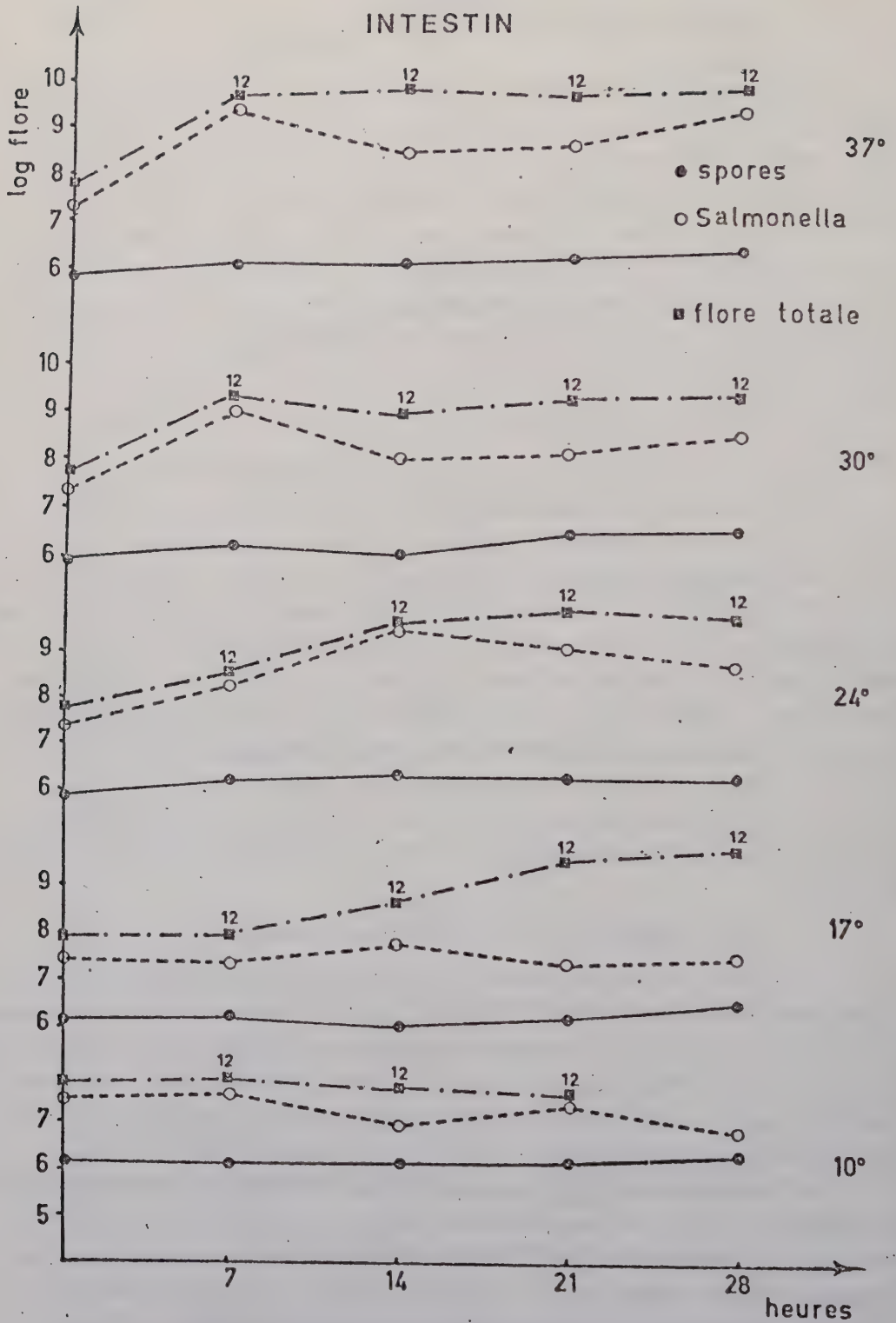


Fig. 15 - Evolution en fonction de la température de la microflore bactérienne dans les intestins artificiels : cas de Salmonella typhimurium.

S. typhimurium et Serratia.

4.2.3 Influence de la température

Les taxons bactériens utilisés sont hébergés par des hôtes homéothermes. Les essais montrent qu'au-dessous de 37° C la multiplication a lieu, les courbes de croissance étant voisines et simplement décalées dans le temps, les unes par rapport aux autres, en fonction de la température. Bien que nous n'ayons pas noté d'évolution à 10° C, ces observations confirment les conclusions de HEUSCHMANN-BRUNNER (1974) concernant la capacité de S. typhimurium à se multiplier à des températures relativement basses chez les poissons d'eau douce. Dans les conditions de l'expérience, la réponse du taxon bactérien à la température est mal définie, et on ne peut a priori extrapoler aux résultats obtenus les courbes de croissance décrites par INGRAHAM (1962). Il n'est pas douteux que pour toutes les bactéries mésophiles, hôtes de vertébrés homéothermes et ayant un optimum de croissance situé entre 37° C et 40° C, le développement à des températures plus basses est une réalité (FARRELL et ROSE, 1967).

4.2.4 Influence du temps de séjour

La réalisation de compartiments digestifs artificiels a pour but de faciliter l'étude du comportement bactérien dans certaines conditions propres au tractus digestif. Il est important d'estimer la représentativité des résultats obtenus in vitro par rapport à ceux relevés in vivo. Chez le poisson vivant, le bol alimentaire, accompagné de bactéries, transite dans les compartiments. Le temps de transit moyen dans chaque compartiment est variable et diminue lorsque la température d'acclimatation des truites augmente (POSSOMPES et al., 1975). LESEL et SECHET (sous presse), ont montré que le temps de transit moyen des bactéries n'est pas obligatoirement celui de la phase solide, et les résultats obtenus dans la première partie de notre étude confirment ces observations. Quantitativement, les microflores totales dénombrées dans les compartiments digestifs (LESEL et PERINGER, sous presse ; LESEL et SECHET, sous presse), et dans EA et IA aux diverses températures, ne sont comparables qu'après destemps d'incubation précis, soit de 7h à 14h, à 10, 17 et peut-être 24° C. Les valeurs obtenues au-dessus sont situées en dehors de la zone thermotrophique de la truite arc-en-ciel. Les temps de séjour supérieurs à 14h ne peuvent être retenus dans l'estomac; pour l'intestin, 21h constitue un temps de séjour limite puisqu'à ce moment, 95% d'un marqueur de transit est éliminé. La représentativité des résultats des essais ne pourra être augmentée qu'après modification de certaines conditions de l'expérimentation et en particulier la modification du rapport initial microflore saprophyte et entérobactéries de contamination.

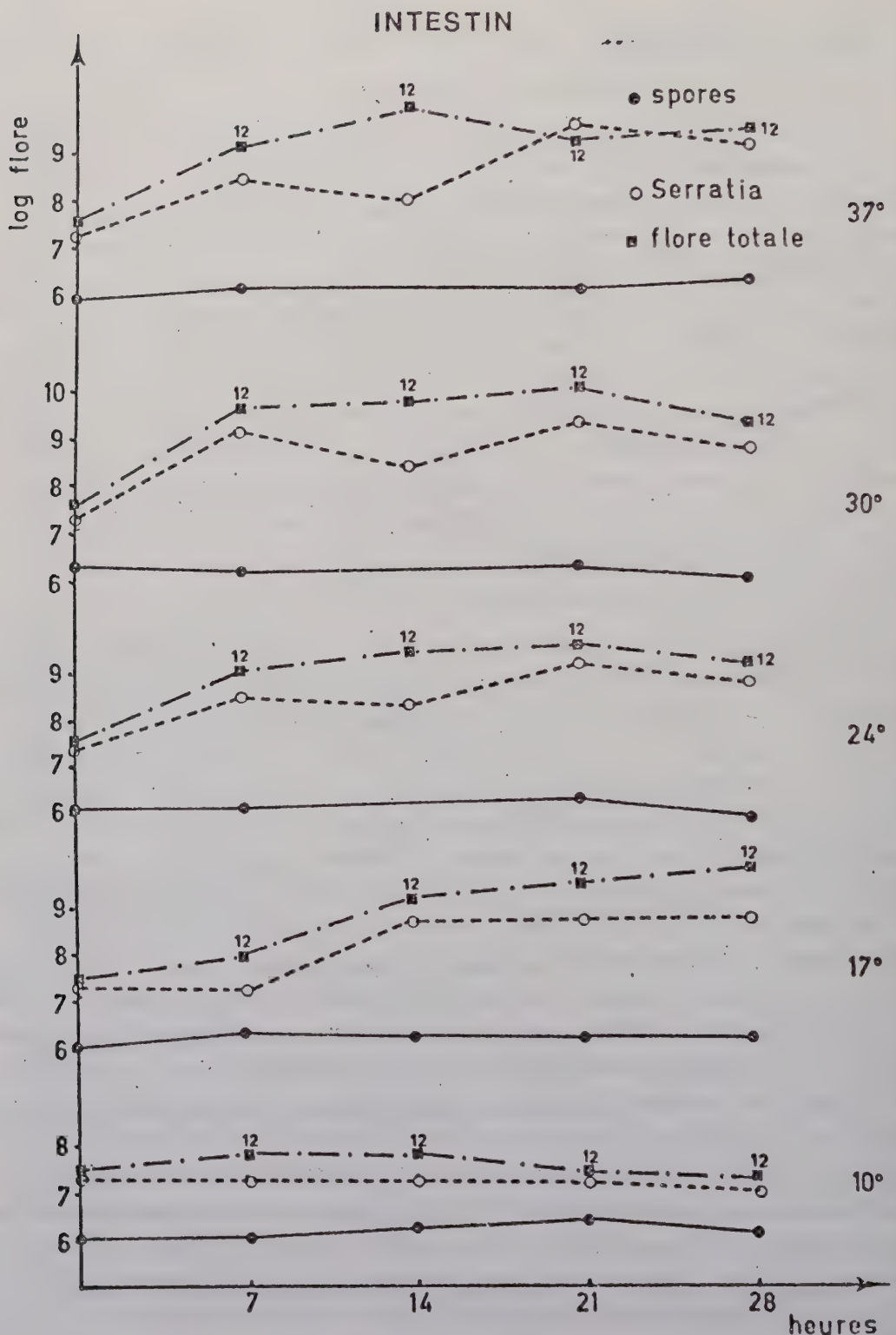


Fig. 16 - Evolution en fonction de la température de la microflore bactérienne dans les intestins artificiels : cas de Serratia.

4.2.5 Influence de l'identité taxonomique

Les essais décrits dans la première partie ont montré un comportement propre à chaque taxon lors du transit digestif. Les courbes de l'évolution des populations dans les EA confirment la réactivité propre à chaque taxon en particulier à 37° C (Serratia sp., E. coli). A cette température, les grandes fluctuations numériques de E. coli sont difficilement explicables. On peut concevoir un équilibre dynamique entre l'Entérobactérie et un microprédateur. En milieu aquatique, deux microprédateurs de E. Coli sont connus : des coliphages (GUELIN, 1954) et une bactérie Bdellovibrio (1976). Sur le plan pratique, ni les coliphages (GUELIN, 1954 et 1962), ni Bdellovibrio (WESTERGAARD et KRAMER, 1977) ne paraissent pouvoir survivre dans le tube digestif des poissons. L'hypothèse la plus vraisemblable pourrait être le développement alterné avec celui d'E. coli de la Corynébactérie provenant de la microflore saprophyte : manifestation in vitro d'un antagonisme bactérien susceptible d'intervenir in vivo et analogue à ce qui a été décrit chez les vertébrés homéothermes (DUCLUZEAU et al., 1976). La confirmation d'un tel phénomène nécessiterait plusieurs répétitions de l'essai EA à 37° C.

De même, le déclin progressif de Serratia dans EA à 37° C,sans développement concomitant d'un taxon provenant de la microflore saprophyte, suggère la libération dans le milieu d'une substance bloquant, voire détruisant les autres taxons présents.

Ces différences montrent que chaque taxon possède une réaction propre dont il convient de tenir compte.

4.3 Influence de l'antibiorésistance

Les germes sensibles à la streptomycine sont susceptibles de subir deux sortes de mutations, apparemment monogéniques, dont les unes leur confèrent une résistance élevée et les autres les rendent streptomycino-dépendants, c'est-à-dire réfractaire à son effet létal, mais encore incapables de se développer en son absence (SENEZ, 1968). Chez E. coli, les fortes concentrations en streptomycine ont paradoxalement pour effet d'accélérer la perte de viabilité mais aussi de protéger les ribosomes des corps cellulaires de la destruction (DAVIS et FEINGOLD, 1962). Ce mode d'action particulier de la streptomycine explique les dénombrements plus élevés des entérobactéries de contamination sur TVGlP sans antibiotique que sur DPTS avec antibiotique. Les bactéries antibiorésistantes se développant sur milieu à la streptomycine subissent un handicap de croissance aisément repéré par une simple numération.

5. CONCLUSIONS

Malgré les limites qu'imposent les conditions artificielles du développement des Entérobactéries de contamination et de la microflore saprophyte, on peut retenir que :

- l'effet limitant de l'acidité gastrique sera d'autant plus marqué que la température sera élevée;
- les entérobactéries provenant de sujets homéothermes se multiplient d'autant mieux en présence de sels biliaires que la température du milieu est plus élevée
- simultanément, en accélérant le transit, la température a pour effet de diminuer le temps de séjour des bactéries dans le tractus digestif et, en conséquence, de limiter les possibilités de multiplication;
- cet effet thermique varie selon le taxon bactérien en cause.

CONCLUSION GENERALE

CONCLUSION

Les résultats obtenus, l'analyse de leur signification appliquée au milieu naturel, la comparaison avec des travaux réalisés par d'autres auteurs, montrent comme il est malaisé d'apporter une réponse univoque à la question initialement posée : les poissons peuvent-ils être vecteurs de bactéries pathogènes pour les vertébrés homéothermes ?

Nous avons vu que l'état physiologique des poissons est déterminant ; un poisson sain, parfaitement adapté à son milieu, n'héberge pas de façon durable les bactéries de contamination. Une forte densité bactérienne et un contact prolongé peuvent entraîner une réaction des poissons qui peuvent alors héberger assez longtemps cette microflore. La température du milieu paraît déterminante, toute augmentation favorisant des populations dont l'optimum de croissance est voisin de 37° C - 40° C.

JANSSEN (1970) a souligné l'importance des remaniements génétiques susceptibles de se produire, une espèce déterminée pouvant communiquer à une autre, ou acquérir, des caractéristiques particulières. Ainsi DUVAL-IFLAH et al. (1980) ont montré qu'un plasmide R pouvait être transféré de Serratia liquefaciens à Escherichia coli, in vitro et in vivo dans le tractus digestif de souris gnotoxéniques hébergeant une flore fécale humaine

Il est logique de penser que l'infinie variété des conditions rencontrées en milieu naturel offre à un taxon déterminé la possibilité de s'adapter, se multiplier, manifester un pouvoir pathogène. Il reste que ces aspects alarmants concernant la santé publique peuvent être tempérés par la connaissance des mécanismes d'épuration naturelle. Présence de microprédateurs bactériens tels que Bdellovibrio (WESTERGAARD et KRAMER, 1977), bactériophages (GUELIN, 1962) mais aussi, bien que leur efficacité in situ puisse être discutée, présence de substances antibiotiques excrétées dans le milieu extérieur (SIEBURTH, 1959 ; AUBERT, 1966 ; BRISOU, 1968 ; LESEL et MENET, 1977). Dans le tube digestif lui-même, certaines bactéries peuvent exercer à l'égard d'autres, des effets barrière en excrétant des substances antibiotiques (DUCLUZEAU et al., 1976) conduisant à l'élimination des taxons sensibles.

Le concept de poisson vecteur de bactéries pathogènes pour les vertébré homéothermes doit être revu en fonction des conditions du milieu, de l'identité taxonomique de la bactérie, des caractéristiques de l'hôte, de la microflore du milieu et du poisson ... De l'analyse précise de ces éléments dépend en partie la qualité sanitaire des productions aquacoles appelées à un grand développement en eaux tempérées et, encore plus peut-être, en eaux réchauffées et en eaux tropicales.

BIBLIOGRAPHIE

AUBERT M., 1965. Le comportement des bactéries terrigènes en mer. Cah. CERBOM, 19-20, 285 p.

BOWEN S.H., 1976. Mechanism for digestion of detrital Bacteria by the Cichlid fish Sarotherodon mossambicus (Peters). Nature (Lond.), 260(5547), 137-138.

BRISOU J., 1968. The behaviour of Bacteria in the presence of products released by marine phytoplankton. In Fourth Int. Nat. Conf. Wat. Poll. Res., Prague, 1-4, Pergamon Press, London.

CHOUBERT G., De la NOUE J. & LUQUET P., 1969. Continuous automatic collector of fish feces. Prog. Fish. Cult., 41, 2, 64-66.

CONTREPOIS M. & GOUET P., 1969. Utilisation d'une technique microbiologique pour la mesure de la vitesse de transit des microparticules dans le tractus digestif des ruminants. C.r. hebd. séanc. Acad. Sci., Paris, 268, 1737-1739.

CZERKAWSKI J.W., 1976. The artificial rumen. Lab. prac., 25, 15-20.

CZERKAWSKI J.W. & BRECKENRIDGE G., 1977. Design and development of a long term rumen simulation technique (Rusitec). Br. J. Nutr., 38, 371-384.

CZERKAWSKI J.W. & BRECKENRIDGE G., 1979. Experiments with the long term rumen simulation technique (Rusitec); response to supplementation of basal rations. Br. J. Nutr., 42, 217-228.

DAVIS B.D. & FEINGOLD D.S., 1962. Antimicrobial agents : mechanisms of action and use in metabolic studies. In GUNSALUS I.C. & STANIER R.Y. (Eds) The Bacteria. A treatise on structure and function, IV, 343-397, Academic Press, London.

DERBLOM H., JOHANSSON H. & NYLANDER G., 1966. A simple method of recording quantitatively certain gastro-intestinal motility functions in the rat. Acta chir. scand., 132, 154-165.

DUCLUZEAU R., BELLIER M. & RAIBAUD P., 1970. Transit digestif de divers inoculums bactériens introduits "per os" chez des souris axéniques et "holoxéniques" (conventionnelles) - Effet antagoniste de la microflore du tractus gastro-intestinal. Zentralbl. Backteriol. Parasitenk, Infektionsk. Hyg. I. Originale, 213, 533-548.

DUCLUZEAU R. & RAIBAUD P., 1979. Ecologie microbienne du tube digestif. 1 vol., Masson, Paris 95 p.

DUVAL-IFLAH Y., RAIBAUD P., TANCREDE C. & ROUSSEAU M., 1980. R-plasmid transfer from Serratia liquefaciens to Escherichia coli in vitro and in vivo in the digestive tract of gnotobiotic mice associated with human fecal flora. Infect. Immun., 28, 3, 981-990.

FOURNAUD J. & MORAND-FEHR C., 1965. Contribution à l'étude microbiologique de la viande désossée et congelée d'origine française. Comparaison avec quelques viandes d'autre origine. Inst. Int. Froid Comm. 4, Karlsruhe, Suppl. Bull., 63-74.

FARRELL J. & ROSE A.H., 1967. Temperature effects on microorganisms. In ROSE A.H. (Ed), Thermobiology, 146-218, Academic Press, New York.

GELDREICH E.E. & CLARKE N.A., 1966. Bacterial pollution indicators in the gastrointestinal tract of freshwater fish. Appl. Microbiol., 14(3), 429-437.

GUELIN A., 1952. Bactériophages et Entérobactéries chez les Poissons et le problème des eaux polluées. Ann. Inst. Pasteur, 83, 46-56.

GUELIN A., 1954. La contamination des Poissons et le problème des eaux polluées. Ann. Inst. Pasteur, 86, 303-308.

GUELIN A., 1962. Polluted waters and the contamination of fish. In G. BORGSTROM (Ed) Fish as food. Nutrition, sanitation and utilization, 2, 481-501, Academic Press, New York.

GUELIN A. & CABIOCH L., 1972. Microbiologie marine. Bactériolyse spontanée et pouvoir bactéricide des eaux douces et marines : isolement d'un nouveau microprédateur. C.R. Acad. Sci. Paris, 274, 3317-3319.

HAVENS L.C. & DEHLER S.A., 1923. The effect of Gambusia affinis on the B. coli index of pollution of water. Ann. J. Hyg., 3, 296-299.

HEUSCHMANN-BRUNNER G., 1974. Experimentelle Untersuchungen über Möglichkeiten und Verlauf einer Infektion mit Salmonella enteridis und Salmonella typhimurium bei Süsswasserfischen. Zentralbl. Bakteriol. Hyg., I. Abt. Originale, (158), 412-431.

HORSLEY R.W., 1973. The bacterial flora of the Atlantic salmon (Salmo salar L.) in relation to its environment. J. Appl. Bact., 36, 377-386.

HORSLEY R.W., 1977. A review of the bacterial flora of Teleosts and Elasmobranchs including methods for its analysis. J. Fish. Biol., 10(6), 529-533.

JANSSEN W.A., 1970. Fish as potential vectors of human bacterial diseases. Spec. Publ., Am. Fish. Soc., 5, 284-290

JANSSEN W.A. & MEYERS C.D., 1968. Fish : Serologic evidence of infection with human pathogens. Science (Wash.), 159, 547-548.

JIAN R., PECKING A., NAJEAN Y. & BERNIER J.J., 1979. Etude de la progression d'un repas dans l'intestin grêle de l'homme par une méthode scintigraphique. Gastroentérologie clin. biol., 3, 755-762.

LESEL M., 1976. Etude de la microflore du tube digestif d'un salmonidé d'élevage. Mise au point technique. Dip. Et. Sup. Sci. Nat., Univ. Bordeaux I, 74 p.

LESEL R., 1979. Données préliminaires sur la microflore du tube digestif de la truite arc-en-ciel Salmo gairdneri Richardson. XXIV° Congrès National Association Française de Limnologie, Marseille. Rev. Biol. Ecol. Mediterr., 6(3-4), 167-174.

LESEL R. & LE JEUNE F., 1980. Survie dans le tube digestif des poissons de bactéries véhiculées par l'eau et pathogènes pour les vertébrés homéothermes. Actes Congr. Assoc. Fr. Limnol., Paris, 25, 111-117.

LESEL R. & PERINGER P. (sous presse). Influence of temperature on the bacterial microflora in Salmo gairdneri Richardson. In : Arch. Hydrobiol, 1981.

LESEL R. & SECHET J., 1981. Influence du stress sur le transit de la microflore bactérienne digestive chez la truite arc-en-ciel Salmo gairdneri Richardson. Acta Oecol. (Appl.), 4, 2. (sous presse).

MARGOLIS L., 1953. The effect of fasting on the bacterial flora in the intestine of fish. J. Fish. Res. Bd Can., 10(2), 62-63.

MATTHEIS T., 1964. Okologie der bakterien im darm von süsswassernutzfishen. III. Familie Enterobacteriaceae, Gattung Escherichia, Aerobacter, Paracolabactrum, Proteus. Z. Fish., 12(8/9/10), 560-580.

MORIARTY D.J.W., 1976. Quantitative studies of bacteria and algae in the food of the Mullet Mugil cephalus L. and the prawn Metapenaeus bennettae (Racek & Dall J. exp. mar. Biol. Ecol., 22, 131-143.

RAIBAUD P., DICKINSON A.B., SACQUET E., CHARLIER H. & MOCQUOT C., 1966. La microflore du tube digestif du rat; I. Techniques d'études et milieux de culture proposés. Annls Inst. Pasteur, Paris, 110, 568-590.

SENEZ J.C., 1968. Microbiologie générale. 1 vol., Doin (Ed.), Paris, 592 p.

SHEWAN J.M., 1961. The microbiology of sea-water fish. In G. BORGSTROM (Ed.) Fish as food. Production, biochemistry, microbiology, 487-560, Academic Press, New York, Vol. 1.

SHEWAN J.M. & HOBBS G., 1967. The bacteriology of fish spoilage and preservation In Hockenhull D.J.D. (Ed.) Progress in industrial microbiology, 129-208, London, Iliffe Books.

SIEBURTH J.M., 1959. Antibacterial activity of Antarctic marine phytoplankton. Limnol., Oceanogr., 4(4), 419-424.

SNEDECOR G.W. & COCHRAN W.G., 1969. Statistical methods. 1 vol., 6° ed., The Io State Univ. Press Ames, 593 p.

SNIESZKO S.F., 1964. Remarks on some facets of epizootology of bacterial fish diseases. Dev. Ind. Microbiol., 5, 97-100.

SUMMERS R.W., HELM J. & CHRISTENSEN J., 1976. Intestinal propulsion in the dog. Its relation to food intake and the migratory myoelectric complex. Gastroenterol., 70, 753-758.

TANNOCK G.W. & SAVAGE D.C., 1974. Influences of dietary and environmental stress on microbial populations in the murine gastrointestinal tract. Infect. Immun., 9, 3, 591-598.

TRUST T.J., 1971. Bacterial counts of commercial fish diets. J. Fish. Res. Bd Can., 28, 1185-1189.

WESTERGAARD J.M. & KRAMER T.T., 1977. Bdellovibrio and the intestinal flora of vertebrates. Appl. Environ. Microbiol. , 34(5), 506-511.

WOOD E.J.F., 1967. Microbiology of Ocean and estuaries. 1 vol., Elsevier Publ. Comp., Amsterdam, 319 p.

Vu : Le Directeur de l'Ecole
Vétérinaire

Professeur R. LAUTIE

u : Le Professeur de l'Ecole Vétérinaire
rapporteur

Ph. Dorchies

Professeur DORCHIES

u : Le Président de la Thèse

Monnier

Professeur MONNIER

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Toulouse, le 8 Mai 1981
P/ LE PRESIDENT DE L'UNIVERSITE
PAUL SABATIER, et par délégation
LE VICE-PRESIDENT,

Professeur L. LARENG

ANNEXES

Annexe n° 1 - COMPOSITION DU GRANULE ALIMENTAIRE

Blé entier broyé	760 g
Tourteau de soja	440 g
Farine de hareng	714 g
Huile de soja	60 g
Complexe sels minéraux-vitamines	6 g
Alginate de sodium	20 g
Eau	700 g

Contient au maximum	11%	d'humidité
	5%	de cellulose
	14%	de matières minérales
Contient au minimum	45%	de matières protéiques
	7%	de matières grasses

Annexe n° 2 - COMPOSITION DES PRINCIPAUX MILIEUX DE CULTURE

MILIEU SPORE

Extrait de viande	10 g
Extrait de levure	2 g
Sulfate de manganèse	40 mg
Glucose stérile 20% ajouté ..	0,1 ml / tube de milieu
Gélose	20 g
Eau	1000 ml
pH : 6,3	

MILIEU DPTS modifié

Protéose peptone	7,5 g
Tryptone	5 g
Desoxycholate de sodium ...	1 g
Safranine	0,02 g
Gélose	10 g
Eau	1000 ml
pH : 7,4 - 7,5	

MILIEU TVG1P

Extrait de viande	5 g
Tryptone	2,5 g
Glucose	1 g
Pourpre de Bromocrésol	0,02 g
Protéose peptone	5 g
Gélose	10 g
Eau	1000 ml
pH : 7,5 - 7,6	

Annexe n° 3 - COMPOSITION DES SOLUTIONS TAMPON

- Solution tampon pH 4

  Phtalate de potassium à 0,05 mole/litre

- Solution tampon pH 7,2

  Solution A : Phosphate monipotassique 68,04 mg/l

  Solution B : Phosphate bipotassique 87,09 mg/l

  La solution tampon pH 7,2 est obtenue en mélangeant 56 ml de solution A a 144 ml de solution B.